



500

PCT
JC2 PCT/PTO 29 MAR 2002
Practitioner's Docket No. 46342/55,965
PATENT

#10

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: T. Ito, et al.
Application No.: 09/857,815
Filed: June 8, 2001
For: BETACELLULIN MUTEIN

Group No.: Unassigned
Examiner: Unassigned

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

TRANSMITTAL OF VERIFIED TRANSLATIONS

Attached herewith is a verified English language translation of each of the priority documents listed below, which we previously filed in this case:

1. Country: Japan
Application Number: 10 (1998)-350377
Filing Date: 9 December 1998
2. Country: Japan
Application Number: 11 (1999)-55326
Filing Date: 3 March 1998

Date: March 20, 2002

Customer No.: 21874


SIGNATURE OF PRACTITIONER

Cara Z. Lowen
Reg. No. 38,227

Dike, Bronstein, Roberts & Cushman
Intellectual Property Practice Group
EDWARDS & ANGELL, LLP
P.O. Box 9169
Boston, MA 02209
Tel. No.: (617) 517-5523
193342

CERTIFICATE OF MAILING (37 C.F.R. 1.8a)

I hereby certify that this correspondence is, on the date shown below, being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Date: March 20, 2002

Signature



Donna M. Tomaso

(type or print name of person certifying)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RECEIVED
APR-3 2022
PCT INITIAL PROCESSING

PCT/JP 99/06873
09/857815

08.12.99

JP 99/6873

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D. 04 FEB 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年12月 9日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第350377号

出 願 人

Applicant (s):

武田薬品工業株式会社

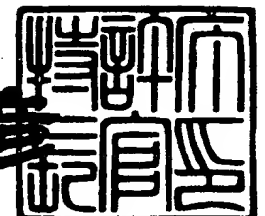
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 1月21日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3094625

【書類名】 特許願

【整理番号】 A98223

【提出日】 平成10年12月 9日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/12
C07K 13/00

【発明の名称】 ベータセルリン改変体

【請求項の数】 7

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県神戸市東灘区向洋町中1丁目10番地101-2
003号

 【氏名】 伊藤 隆司

【発明者】

 【住所又は居所】 岐阜県岐阜市本荘中ノ町10丁目3番地

 【氏名】 中山 光代

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京田辺市田辺勇田80-50

 【氏名】 田中 葉子

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県川辺郡猪名川町松尾台2-1-12 E502

 【氏名】 小林 昌行

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市左京区下鴨宮崎町66番地の3

 【氏名】 五十嵐 貢一

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県川西市大和西1丁目54番地の16

 【氏名】 西村 紀

【特許出願人】

 【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代表者】 武田 國男

【代理人】

【識別番号】 100073955

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【弁理士】

【氏名又は名称】 内山 務

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ベータセルリン改変体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ベータセルリンの N 末端から 1 ないし 40 個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C 末端から 1 ないし 4 番目のアミノ酸残基において、C 末端から 3 番目のアミノ酸残基 Leu もしくは C 末端から 4 番目のアミノ酸残基 Asp を含む 1 ないし 4 個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテインまたはその塩。

【請求項 2】 N 末端から 1 ないし 40 個のアミノ酸残基が欠失した請求項 1 記載のベータセルリンムテインまたはその塩。

【請求項 3】 ①配列番号：1 で表されるアミノ酸配列、②配列番号：1 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 1 ないし 40 個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、③配列番号：2 で表されるアミノ酸配列または④配列番号：2 で表されるアミノ酸配列の N 末端から 1 ないし 40 個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を含有する請求項 1 記載のベータセルリンムテインまたはその塩。

【請求項 4】 ①配列番号：1 で表されるアミノ酸配列、②配列番号：2 で表されるアミノ酸配列、③配列番号：3 で表されるアミノ酸配列または④配列番号：4 で表されるアミノ酸配列を含有する請求項 1 記載のベータセルリンムテインまたはその塩。

【請求項 5】 請求項 1 記載のベータセルリンムテインをコードする DNA を含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該ベータセルリンムテインを生成せしめることを特徴とする請求項 1 記載のベータセルリンムテインまたはその塩の製造法。

【請求項 6】 請求項 1 記載のベータセルリンムテインまたはその塩を含有してなる医薬組成物。

【請求項 7】 請求項 1 記載のベータセルリンムテインまたはその塩を含有してなる糖尿病予防・治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はベータセルリンの膵臓β細胞への分化促進活性（BTC活性）を保持したまま平滑筋細胞等の増殖促進活性（EGF活性）を低減させたムテイン（以下、改変体と称することもある）及びその製造法などに関する。

【0002】

【従来技術】

ヒトベータセルリンは、178アミノ酸からなる前駆体より切り出された80アミノ酸からなる蛋白性因子でその全アミノ酸配列が明らかにされている[Sasadaら；バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.) , 190:1173 (1993)]。ベータセルリンは当初マウス3T3細胞に対する増殖促進活性を持つ因子として見出されたが、その後、血管平滑筋細胞、網膜色素上皮細胞に対しても増殖促進活性（EGF活性）を有することが明らかとなった[Shingら；サイエンス (Science) , 259:1604 (1993)]。さらに、ベータセルリンは膵臓未分化肝細胞に作用して、インシュリンを産生する膵臓β細胞への分化を促進する作用（BTC活性）を有することが明らかとなった[Mashimaら；ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲーション (J Clin. Invest.) , 97:1647(1996)]。

インシュリンを産生する膵臓β細胞への分化促進作用を有することから、ベータセルリンは、糖尿病（例えば、インスリン依存性糖尿病）、糖尿病における膵臓機能障害などの予防・治療剤として有用であるものと考えられる[Miyagawaら、1997年日本糖尿病学会 講演要旨集, 125]（根拠文献などをご教示下さい）。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながらベータセルリンは前述のような血管平滑筋細胞、網膜色素上皮細胞に対する増殖促進活性を併せ持つため、糖尿病治療剤として応用する場合にはこれらの増殖活性が問題である。

そのため膵臓β細胞への分化促進作用を維持したまま、血管平滑筋細胞等に対する増殖促進活性を低減することが可能であるならば、より医薬品としての可能性を高めることができるが、これまでそのようなベータセルリン改変体については知られていない。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らはベータセルリンの改変体について種々の検討を重ねた結果、ベータセルリンの改変により膵臓β細胞への分化促進活性を保持したまま平滑筋細胞等の増殖促進活性を低減させることを可能たらしめるベータセルリン改変体であって、生体内に投与した場合に抗原性の問題を生じない改変体を初めて見出し、さらに研究を続けた結果、本発明を完成させた。すなわち、本発明はベータセルリンの改変体及びその改変体を取得する方法などに関する。

【0005】

すなわち、本発明は、

(1) ベータセルリンのN末端から1ないし40個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から1ないし4番目のアミノ酸残基において、C末端から3番目のアミノ酸残基LeuもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基Aspを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテインまたはその塩、

(2) N末端から1ないし40個のアミノ酸残基が欠失した上記(1)記載のベータセルリンムテインまたはその塩、

(3) ①配列番号：1で表されるアミノ酸配列、②配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から1ないし40個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、③配列番号：2で表されるアミノ酸配列または④配列番号：2で表されるアミノ酸配列のN末端から1ないし40個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を含有する上記(1)記載のベータセルリンムテインまたはその塩、

(4) ①配列番号：1で表されるアミノ酸配列、②配列番号：2で表されるアミノ酸配列、③配列番号：3で表されるアミノ酸配列または④配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有する上記(1)記載のベータセルリンムテインまたはそ

の塩、

(5) 上記(1)記載のベータセルリンムテインをコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該ベータセルリンムテインを生成せしめることを特徴とする上記(1)記載のベータセルリンムテインまたはその塩の製造法、

(6) 上記(1)記載のベータセルリンムテインまたはその塩を含有してなる医薬組成物、

(7) 上記(1)記載のベータセルリンムテインまたはその塩を含有してなる糖尿病予防・治療薬などに関する。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明のベータセルリン改変体(ベータセルリンムテイン)は、上述のとおり、BTC活性を保持したまま、EGF活性が減弱されている。

BTC活性を保持したまま、EGF活性が減弱された本発明のベータセルリンムテインとして具体的には、ベータセルリンのN末端から1ないし40個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から1ないし4番目のアミノ酸残基において、C末端から3番目のアミノ酸残基LeuもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基Aspを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテインまたはその塩などがあげられ、さらに具体的には、N末端から1ないし40個のアミノ酸残基が欠失した前述のベータセルリンムテインなどがあげられる。

ここで、ベータセルリンとは、Sasadaら; バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 190:1173 (1993)に記載のとおり、Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pr Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr (配列番号: 35) で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドのことを意味す

る。

上記の「他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテイン」中の他の「他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換」とは、BTC活性を保持したまま、EGF活性が減弱された本発明のベータセルリンムテインの「BTC活性を保持したまま、EGFが減弱される」という特徴を損なわない範囲での置換であって、他のアミノ酸への置換により、当該ベータセルリンを生体内に投与した際に抗原性の問題が生じない程度の置換であれば特にアミノ酸残基もしくはペプチド鎖の種類は問わない。上記の「他のアミノ酸」の具体例をあげれば、該アミノ酸配列中のアミノ酸が属するところのクラスのうち他のアミノ酸類から選ぶことができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどがあげられる。極性（中性）アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどがあげられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどがあげられる。負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などがあげられる。上記の「他のペプチド鎖」の具体例としては、上記の「他のアミノ酸」が2個以上結合してなるペプチド鎖のことをいい、好ましくは2ないし4個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖などがあげられる。

【0007】

「ベータセルリンのN末端から1ないし40個のアミノ酸残基が欠失していてもよくC末端から1ないし4番目のアミノ酸残基において、C末端から3番目のアミノ酸残基LeuもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基Aspを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテイン」の具体的な例としては、

(1) ベータセルリンのN末端から76番目までのアミノ酸配列 (Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu

Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val) を保持し、C末端から1ないし4番目のアミノ酸残基 (Asp Leu Phe Tyr) において、C末端から3番目のアミノ酸残基LeuもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基Aspを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテイン、例えば、

① Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val (配列番号: 2) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

② Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp (配列番号: 1) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

③ Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe Tyr (配列番号: 5) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

④ Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe (配列番号: 6) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

⑤ Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu (配列番号：7) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

⑥ Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe Tyr (配列番号：8) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

⑦ Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe (配列番号：9) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、および

⑧ ベータセルリンのC末端から3番目のアミノ酸残基 (Leu) が他のアミノ酸残基で置換されたベータセルリンムテインなどがあげられる。

なかでも、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテインまたは配列番号：2で表されるベータセルリンムテインが特に好ましい例としてあげられる。

【0008】

(2) ベータセルリンのN末端から1ないし40番目までのアミノ酸残基 (Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys) が欠失していてもよく、

N末端から41番目ないし76番目のアミノ酸配列 (Gln Tyr Lys His Tyr Cys

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val) を保持し、C末端から1ないし4番目のアミノ酸残基 (Asp Leu Phe Tyr) において、C末端から3番目のアミノ酸残基LeuもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基Aspを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテイン、

好ましくは、ベータセルリンのN末端から1ないし37番目までのアミノ酸残基 (Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg) が欠失していてもよく、

N末端から38番目ないし76番目のアミノ酸配列 (Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val) を保持し、C末端から1ないし4番目のアミノ酸残基 (Asp Leu Phe Tyr) において、C末端から3番目のアミノ酸残基LeuもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基Aspを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテイン、例えば、

① Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val (配列番号: 4) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

② Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp (配列番号: 3) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

③ Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pr Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe Tyr (配列番号: 10) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

④ Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile
Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp
Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe (配列番号：11) で
表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

⑤ Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile
Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp
Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu (配列番号：12) で表さ
れるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

⑥ Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile
Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp
Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe Tyr (配列番号：13
) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

⑦ Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile
Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp
Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe (配列番号：14) で
表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、および

⑧ ベータセルリンのN末端から31ないし80番目のアミノ酸配列で表される
部分ペプチドにおいて、C末端から3番目のアミノ酸残基 (Leu) が他のアミ
ノ酸残基で置換されたベータセルリンムテインなどがあげられる。

なかでも、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンム
テインまたは配列番号：4で表されるベータセルリンムテインが特に好ましい例
としてあげられる。

【0009】

上記(1)、(2)に記載の本発明のベータセルリンムテインの好ましい例中
、特に好ましいものとしては、①配列番号：1で表されるアミノ酸配列、②配列
番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から1ないし40個のアミノ酸が欠失
したアミノ酸配列、③配列番号：2で表されるアミノ酸配列または④配列番号：
2で表されるアミノ酸配列のN末端から1ないし40個のアミノ酸が欠失したア
ミノ酸配列を含有するベータセルリンムテイン、

さらに好ましくは、①配列番号：1で表されるアミノ酸配列、②配列番号：2で表されるアミノ酸配列、③配列番号：3で表されるアミノ酸配列または④配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテインがあげられる。

【0010】

本明細書におけるベータセルリンムテインはペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。またこれらのベータセルリンムテインはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。エステルのRとしては、例えばメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル、もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキルなどの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルエステルなどがあげられる。

本発明のベータセルリンムテインの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0011】

本発明のベータセルリンムテインは、例えば、特開平6-87894に記載の遺伝子工学的又はベータ腫瘍細胞の培養により得られたベータセルリンを自体公知のプロテアーゼ処理、好ましくはカルボキシペプチダーゼ処理さらに好ましくはウシ脾臓カルボキシペプチダーゼA処理することによっても調製する事が可能である。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。また、後述する

ベータセルリンムテインをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。

ベータセルリンをヒトや温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや温血動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

【0012】

ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のベータセルリンムテインを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のベータセルリンムテインを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- ①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- ②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- ④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)
- ⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のポリペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0013】

ベータセルリンムテインのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合

成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、必要に応じて高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のベータセルリンムテインを取得する。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはDCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOObtなど)とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえばN,N'-ジメチルホルムアミド、N,N'-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃~5

0℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5ないし4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばRとして上記したC₁₋₆アルキル基、C₃₋₈シクロアルキル基、C₇₋₁₄アラルキル基の他、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭素から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fm cなどが挙げられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（たとえば、ペンタクロロフェノール、

2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt) とのエステル] などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

【0014】

保護基の除去(脱離)方法としては、たとえばPd黒あるいはPd炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に $-20^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

ポリペプチドのアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド(またはアミノ酸)とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペ

チドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドのアミド体を得ることができる。

ベータセルリンムテインのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチドのアミド体と同様にして所望のポリペプチドのエステル体を得ることができる。

【0015】

本発明のベータセルリンムテインをコードするDNAとしては、ベータセルリンのN末端から1ないし40個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から1ないし4番目のアミノ酸残基において、C末端から3番目のアミノ酸残基LeuもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基Aspを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテインをコードするDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。具体的には、本発明の配列番号：1ないし配列番号：14で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテインをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。

より具体的には、(1)配列番号：1ないし配列番号：14で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリンムテインをコードするDNAとしては、配列番号：15ないし配列番号：28で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(2)ストリンジェントな条件下で(1)で規定された配列とハイブリダイズする哺乳動物由来のDNA、(3)遺伝コードの縮重のため(1)および(2)に定められている配列とハイブリッド形成しないが、同一アミノ酸配列をもつポリペプチドをコードするDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じた方法に従って行うことができる。上記ストリンジェントな条件としては、例えば42℃、50%ホルムアミド、4×SSPE(1×SSPE=150mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄·H₂O, 1mM EDTA pH7.4)、5×デンハート溶液、0.1% SDSである。

【0016】

本発明のベータセルリンムテインを、ベータセルリンムテインをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって製造する場合に用いられる本発明のベータセルリンムテインの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のベータセルリンムテインをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

【0017】

形質転換する際の宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどが利用できる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、T7プロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADH1プロモーター、GALプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることがで

きる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、 $dhfr$ と略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、 Amp^r と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、 Neo と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO ($dhfr^-$) 細胞を用いてDHFR遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ベータセルリンムテインのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、 $phoA$ ・シグナル配列、 $OmpA$ ・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイティングファクター α ($MF\alpha$)・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築されたベータセルリンムテインをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0018】

宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫または昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103〔ヌクレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600〔ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)], MM294〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエ

スエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A) , 73巻, 4174(1976)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)] , 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (*Journal of Biochemistry*) , 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

【0019】

酵母としては、たとえばサッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。

昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (*Nature*) , 315巻, 592(1985)] 。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 [以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィトロ (*in Vitro*) , 13巻, 213-217頁 (1977年)] などが用いられる。

動物細胞としては、たとえばサルCOS-7細胞、Vero細胞、チャイニーズハムスター細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (dhfr-CHO細胞)、マウスL細胞、マウス3T3細胞、マウスミエローマ細胞、ヒトHEK293細胞、ヒトFL細胞、293細胞、C127細胞、BALB3T3細胞、Sp-2/O細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A) , 69巻, 2110(1972)やジーン (*Gen*e) , 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。

バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行われる。

酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 75巻, 1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。

【0020】

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、たとえばバイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6巻, 47-55頁(1988年)などに記載の方法に従って行なわれる。

動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。

発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リポフェクション法 [Feigner, P.L. et al. プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proceedings of the Natinal Academy of Sciences of the United States of America), 84巻, 7413頁(1987年)]、リン酸カルシウム法 [Graham, F. L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456-467頁(1973年)]、電気穿孔法 [Nuemann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.), 1巻, 841-845頁(1982年)] 等が挙げられる。

このようにして、本発明のベータセルリンムテインをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

なお、動物細胞を用いて、本発明のベータセルリンムテインを安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローン選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローン選択を行なうことにより本発明のベータセルリンムテイン等の高発現能を有する安定な動物細胞株を得る

ことができる。また、d h f r 遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX 濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、d h f r 遺伝子とともに、本発明のベータセルリンムテインをコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。

上記の形質転換体を本発明のベータセルリンムテインをコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、本発明のベータセルリンムテインを生成、蓄積せしめることによって、本発明のベータセルリンムテインを製造することができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5〜8が望ましい。

【0021】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15〜43℃で約3〜24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30〜40℃で約6〜24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングス・

オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A) , 77巻, 4505(1980)] や 0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら, 「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A) , 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0022】

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature) , 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science) , 122巻, 501(1952)] , DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology) , 8巻, 396(1959)] , RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)] , 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine) , 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

特にCHO (dhfr⁻) 細胞およびdhfr遺伝子を選択マーカーとして用いる場合には、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用いるのが好ましい。

【0023】

上記培養物から本発明のベータセルリンムテインを分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。

本発明のベータセルリンムテインを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100（登録商標。以下、TMと省略することがある。）などの界面活性剤が含まれていてもよい。

培養液中にベータセルリンムテインが分泌される場合には、培養終了後、自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明のポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法やクロマトフォーカシングなどの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる本発明のベータセルリンムテインが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができる、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する本発明のベータセルリンムテインを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ベータセルリンムテインを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

得られるベータセルリンムテインは、例えば、特開平10-191989号等に記載のリフォールディング工程に付してもよい。また、N末端のMetが付加

したベータセルリンムテインを特開平10-191989号等に記載のN末端のMetの除去反応に付すことにより、N末端のMetを除去することもできる。

かくして生成する本発明のベータセルリンムテインの存在は特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0024】

本発明のベータセルリンムテインをコードするDNAまたは本発明のベータセルリンムテインは、糖尿病（例えば、インシュリン依存性糖尿病など）、糖尿病における膵臓機能障害、老人性のインシュリン分泌低下に伴う膵臓機能低下症などの改善剤および未分化型膵臓ガンなど（特に糖尿病（例えば、インシュリン依存性糖尿病など）の予防・治療薬など）の医薬の開発に用いることができる。

【0025】

さらに、本発明のベータセルリンムテインまたはそれをコードするDNAはEGF活性が減弱されていることおよび抗原性の問題がないことから、安全で低毒性な医薬として有用である。本発明のポリペプチドまたはそれをコードするDNAは、糖尿病（例えば、インシュリン依存性糖尿病）、糖尿病における膵臓機能障害、老人性のインシュリン分泌低下に伴う膵臓機能低下症などの改善剤および未分化型膵臓ガンなどの疾病の治療・予防剤として用いることができる。

本発明のベータセルリンムテインまたはそれをコードするDNAを上述の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするのである。

【0026】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのようない甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのようない香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のようない液状担体を含むすることができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようないベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのようない天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、マントヒヒ、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のベータセルリンムテインの投与量は、症状などにより差異はあるが、

経口投与の場合、一般的に成人の糖尿病患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.1 から 100 mg、好ましくは約 1.0 から 50 mg、より好ましくは約 1.0 から 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人の糖尿病患者（体重 60 kg として）への投与においては、一日につき約 0.01 から 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 から 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 から 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

【0027】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければ L 体を示すものとする。

【0028】

(不必要な略号をご消去ください)

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
APMSF	: (p-アミジノフェニル)メタンスルホニルフルオリド塩酸塩
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
TFA	: トリフルオロ酢酸
Gly	: グリシン

Ala : アラニン
 Val : バリン
 Leu : ロイシン
 Ile : イソロイシン
 Ser : セリン

【0029】

Thr : スレオニン
 Cys : システイン
 Met : メチオニン
 Glu : グルタミン酸
 Asp : アスパラギン酸
 Lys : リジン
 Arg : アルギニン
 His : ヒスチジン
 Phe : フェニルアラニン
 Tyr : チロシン
 Trp : トリプトファン
 Pro : プロリン
 Asn : アスパラギン
 Gln : グルタミン
 Me : メチル基
 Et : エチル基
 Bu : ブチル基
 Ph : フェニル基
 TC : チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
 Bom : ベンジルオキシメチル
 NMP : N-メチルピロリドン
 PAM : フェニルアセトアミドメチル

【0030】

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

T o s : p-トルエンスルフォニル

H O N B : N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド

B z l : ベンジル

Z : ベンジルオキシカルボニル

B r - Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル

C l - Z : 2-クロルベンジルオキシカルボニル

B o c : t-ブチルオキシカルボニル

H O B t : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール

D C C : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

T F A : トリフルオロ酢酸

F m o c : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル

D N P : ジニトロフェニル

B u m : ターシャリーブトキシメチル

T r t : トリチル

【0031】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC1-77）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC1-76）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC31-77）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC31-76）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：5〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC1-76、78-80）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：6〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC1-76、78、79）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：7〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC1-76、78）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：8〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC1-77、79、80）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：9〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC1-77、80）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：10〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC31-76、78-80）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：11〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC31-76、78、79）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：12〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC31-76、78）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：13〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC31-77、79、80）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：14〕

本発明のベータセルリンムテイン（BTC31-77、79）のアミノ酸配列

を示す。

〔配列番号：15〕

配列番号：1で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

配列番号：2で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

配列番号：3で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

配列番号：4で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

配列番号：5で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

配列番号：6で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕

配列番号：7で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕

配列番号：8で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：23〕

配列番号：9で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

配列番号：10で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

配列番号：11で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

配列番号：12で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

配列番号：13で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

配列番号：14で表されるアミノ酸配列で表されるベータセルリンムテインをコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

後述の実施例1および実施例4で用いられたプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

後述の実施例1および実施例4で用いられたプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

後述の実施例9で用いられたプライマーRI-1の塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

後述の実施例9で用いられたプライマーRI-3の塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

後述の実施例9で用いられたプライマーRI-1C1aの塩基配列を示す。

〔配列番号：34〕

後述の実施例9で用いられたプライマーRI-3Xhoの塩基配列を示す。

〔配列番号：35〕

ベータセルリンのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：36〕

ベータセルリンをコードするcDNAの塩基配列を示す。

【0032】

後述の実施例1で得られた形質転換体大腸菌[エシェリヒア コリ (Escherichia coli)] MM294(DE3)/ pTCIIBTC77は受託番号FERM BP-6584として1998年11月24日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託されている。また1998年11月2日付で受託番号IFO 16214として財団法人発酵研究所(IFO)に寄託されている。

また、後述の実施例4で得られた形質転換体大腸菌[エシェリヒア コリ (Escherichia coli)] MM294(DE3)/ pTCIIBTC76は受託番号FERM BP-6583として1998年11月24日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。また1998年11月2日付で受託番号IFO 16213として財団法人発酵研究所(IFO)に寄託されている。

【0033】

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0034】

実施例1. 77残基型(C末端3残基欠失型)ベータセルリン発現株の構築
77残基型(C末端3残基欠失型)ベータセルリンの構造遺伝子を、ベータセルリン発現プラスミドpBO41[Senoら; Growth Factors, 13:181(1996)]より、構造遺伝子上流に隣接してNde I切断部位及び開始コドンを持つプライマー1(5'-CATATGGATGGGAATTCCACCAGAAGTCCTG)、及び77番目のアスパラギン酸の後に終始コドン及びBam HI切断部位を持つプライマー2(5'-GGATCCCTAGTCAACTCTCTCACACCTTGCTCC)を用いて、PCRで増幅した。PCRにより増幅した遺伝子を、TA riginal cloning kit (インヴィトロジェン社製)を用いてpCR2.1ベクターに連結し、pCR2.1/BTC77を作製した。これを大腸菌JM109に導入し、アンピシリン耐性とβ-ガラクトシダーゼ活性を指標として形質転換体を選択した。pCR2.1/BTC77を有する形質転換体を培養し、QIAprep8 Miniprep kit (キアゲン社製)を用いてpCR2.1/BTC77を調製した。

77残基型（C末端3残基欠失型）ベータセルリンの発現プラスミドは以下のよう
に構築した。pBR322をNde Iで切断、T4 DNAポリメラーゼ（DNA Blunting kit,
宝酒造株式会社製）で末端を平滑化し、再度連結する事によって、Nde I認識部
位を欠損させたpBRdesNdeを作製した。pET3cをBgl II - Eco RVで切断し、約0.2
6kbpの断片を回収した後、T4 DNAポリメラーゼで末端を平滑化し、pBRdesNdeのS
ca I断片と連結して、pBR/T7 desNdeを作製した。また、部位特異的変異導入（Q
uick Change, STRATAGENE社製）により、pBR322のBam HI認識部位を欠損させたp
BR322desBamを作製した。pBR322desBamのSph I - Eco RV断片をpBR/T7 desNdeの
Sph I - Eco RV断片と連結して、テトラサイクリン耐性発現ベクターpTCIIを作
製した。pCR2.1/BTC77をNde I及びBam HIで切断してアガロース電気泳動を行い
、約240 bpの77残基型ベータセルリン構造遺伝子をQIAquick Spin Purificati
on Kit（キアゲン社製）を用いてを回収した。発現ベクターpTCIIをNde I及びB
am HIで切断してアガロース電気泳動を行い、同様に約4.6 kbpのバンドを回収し
た。77残基型ベータセルリン構造遺伝子を発現ベクターpTCIIのNde I- Bam HI
断片と連結した後、大腸菌JM109に導入してテトラサイクリン耐性で形質転換株
を選択し、その株より再度プラスミドを回収して、発現プラスミドpTCII/BTC77
とした。

このpTCII/BTC77を大腸菌MM294(DE3)に導入して、テトラサイクリン耐性で形質
転換株を選択し、77残基型ベータセルリン発現株MM294(DE3)/ pTCIIBTC77を取
得した。この形質転換細胞大腸菌MM294(DE3)/ pTCIIBTC77は受託番号FERM
BP-6584として1998年11月24日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研
究所（NIBH）に寄託された。また1998年11月2日付で受託番号IFO 1621
4として財団法人発酵研究所（IFO）に寄託された。

【0035】

実施例2. 77残基型ベータセルリン発現株の培養

77残基型ベータセルリン発現株MM294(DE3)/ pTCIIBTC77を10mg/Lのテトラサイ
クリンを含むLB培地（1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム）1
リットルで30℃16時間培養した。得られた培養液150mLを主発酵用培地（1.68%
リン酸一水素ナトリウム、0.3%リン酸二水素ナトリウム、0.1%塩化アンモニウ

ム、0.05%塩化ナトリウム、0.024%硫酸マグネシウム、0.02%ニューポールLB-625、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.0%カザミノ酸、1.0%イーストエキス) 1.5リットルを仕込んだ2L容ジャーファーマンターに移植して、37℃、通気量 2 L/min、攪拌回転数 500 rpm で通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約1200クレット単位になった時点で、5.95 mg/L 分のイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加した。IPTG添加時、添加後1, 2.5時間に0.75%のグルコースを添加し培養開始9時間後まで培養を行った。培養液を10000 rpmで30分間遠心分離を行い、菌体を集めた。

【0036】

実施例3 .Met-77残基型ベータセルリンの精製

実施例2で得られた菌体5 gに1 mM EDTA, 1mM APMSF及び7M グアニジン塩酸塩を含む0.1 M Tris-HCl (pH8.0) 10 mLを加え、4℃で一晩攪拌し抽出を行った後、遠心分離 (10000 rpm、20分間) を行った。得られた上清液10 mLに0.5 mM酸化型グルタチオン、1 mM還元型グルタチオン、1 mM EDTA、0.1 Mアルギニン塩酸塩及び2 M尿素を含む50 mM Tris-HCl (pH8.0) 250 mLを加え、4℃で一晩リフォールディングを行った後、遠心分離 (10000 rpm、20分間) を行い、遠心上清液260 mLを得た。この遠心上清液をYM3膜 (分画分子量: 3000、ミリポア社) を用いて濃縮を行った。濃縮脱塩液80 mLに2 M尿素を120 mL加えた後、塩酸でpH 5.0に調整した。遠心分離 (10000 rpm、20分間) を行い、得られた遠心上清液を50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で平衡化したSP-トヨパール650Mカラム (2.2 cm x 12 cm、東ソー社) に毎分 10 mLの流速で吸着させ、平衡化に用いた緩衝液でよく洗浄した後、0 Mから1.0 Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。Met-77残基型ベータセルリンを含む画分を集め、その1/3量を0.1 %トリフルオロ酢酸で平衡化したC4P-50カラム (1.0 cm x 25 cm、昭和電工社) に吸着させ、13.5 %から21.2 %のアセトニトリル直線濃度勾配によりMet-77残基型ベータセルリンを溶出した。同じ操作をさらに2回行い得られた溶出液を0.02 % トリフルオロ酢酸で透析し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥粉末を蒸留水10 mLで溶解し、酢酸型にしたAG1-X8カラム (1.0 cm x 10 cm、日本バイオラッド社) を通過させた後、再度凍結乾燥を行いMet-77残基型ベータセルリン8 mgを得た。

【0037】

実施例 4.76 残基型 (C末端4 残基欠失型) ベータセルリン発現プラスミドの構築

76 残基型 (C末端4 残基欠失型) ベータセルリンの構造遺伝子を、実施例 1 で構築した pTCII/BTC77 より、構造遺伝子上流に隣接して Nde I 切断部位及び開始コドンを持つプライマー 1 (5'-CATATGGATGGGAATTCCACCAGAAGTCCTG)、及び 76 番目のバリンの後に終始コドン及び Bam HI 切断部位を持つプライマー 2 (5'-GGATCCCTAAACTCTCTCACACCTTGCTCCAATG) を用いて、PCR で増幅した。PCR により増幅した遺伝子を、TA original cloning kit (インヴィトロジェン社製) を用いて pCR2.1 ベクターに連結し、pCR2.1/BTC76 を作製した。これを大腸菌 JM109 に導入し、アンピシリン耐性と β -ガラクトシダーゼ活性を指標として形質転換体を選択した。pCR2.1/BTC76 を有する形質転換体を培養し、QIAprep8 Miniprep kit (キアゲン社製) を用いて pCR2.1/BTC76 を調製した。

76 残基型 (C末端4 残基欠失型) ベータセルリンの発現プラスミドは以下のように構築した。pCR2.1/BTC76 を Nde I 及び Bam HI で切断してアガロース電気泳動を行い、約 240 bp の 76 残基型ベータセルリン構造遺伝子を QIAquick Spin Purification Kit (キアゲン社製) を用いて回収した。実施例 1 で調製した発現ベクター pTCII を Nde I 及び Bam HI で切断してアガロース電気泳動を行い、同様に約 4.6 kbp のバンドを回収した。76 残基型ベータセルリン構造遺伝子を発現ベクター pTCII の Nde I- Bam HI 断片と連結した後、大腸菌 JM109 に導入してテトラサイクリン耐性で形質転換株を選択し、その株より再度プラスミドを回収して、発現プラスミド pTCII/BTC76 とした。

この pTCII/BTC76 を大腸菌 MM294 (DE3) に導入して、テトラサイクリン耐性で形質転換株を選択し、76 残基型ベータセルリン発現株 MM294 (DE3) / pTCIIBTC76 を取得した。この形質転換細胞大腸菌 MM294 (DE3) / pTCIIBTC76 は受託番号 FERM BP-6583 として 1998 年 11 月 24 日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託された。また 1998 年 11 月 2 日付で受託番号 IFO 16213 として財団法人発酵研究所 (IFO) に寄託された。

【0038】

実施例 5.76 残基型ベータセルリン発現株の培養

76 残基型ベータセルリン発現株 MM294(DE3)/ pTCIIBTC76 を 10mg/L のテトラサイクリンを含む LB 培地 (1% ペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム) 1 リットルで 30℃ 16 時間培養した。得られた培養液を主発酵用培地 (1.68% リン酸一水素ナトリウム、0.3% リン酸二水素ナトリウム、0.1% 塩化アンモニウム、0.05% 塩化ナトリウム、0.024% 硫酸マグネシウム、0.02% ニューポール LB-625、0.0005% 塩酸チアミン、1.5% ブドウ糖、1.0% カザミノ酸、1.0% イーストエキス) 20 リットルを仕込んだ 50L 容発酵槽に移植して、37℃、通気量 20 L/min、攪拌回転数 210 rpm で通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約 1200 クレット単位になった時点で、5.95 mg/L 分のイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加した。IPTG 添加時、添加後 2 及び 3.5 時間にそれぞれ 0.75% のグルコースを添加し培養開始 11 時間後まで培養を行った。培養液を 10000 rpm で 30 分間遠心分離を行い、菌体 540 g を集めた。

【0039】

実施例 6. Met-76 残基型ベータセルリンの精製

実施例 5. で得られた菌体 375 g に 1 mM EDTA、1 mM APMSF 及び 7M グアニジン塩酸塩を含む 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 1.0 L を加え、4℃ で一晩攪拌し抽出を行った後、遠心分離 (10000 rpm、20 分間) を行った。得られた上清液 1.0 L に 0.5 mM 酸化型グルタチオン、1 mM 還元型グルタチオン、1 mM EDTA、0.1 M アルギニン塩酸塩及び 2 M 尿素を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 19 L を加え、4℃ で一晩リフォーリングを行った後、遠心分離 (10000 rpm、20 分間) を行い、遠心上清液 20 L を得た。この遠心上清液をペリコンカセットシステム (分画分子量: 5000、ミリポア社) を用いて濃縮を行った。濃縮脱塩液 3.3 L に 2 M 尿素を 13.2 L 加えた後、塩酸で pH 5.0 に調整した。50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した POROS 50HS カラム (2.2 cm x 12 cm、日本パーセプティブ社) に毎分 30 mL の流速で吸着させ、平衡化に用いた緩衝液でよく洗浄した後、0.3 M から 1.3 M の塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。76 残基型ベータセルリンを含む画分を集め、蒸留水で 3 倍に希釈した後、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.

5) で平衡化したTSKgel CM-5PWカラム (2.15 cm x 15 cm、東ソー社) に添加した。Met-76残基型ベータセルリンが吸着したTSKgel CM-5PWカラムを、0.24 M から0.44 Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。Met-76残基型ベータセルリンを含む画分を集め、0.1 %トリフルオロ酢酸で平衡化したTSKgel ODS-120Tカラム (2.15 cm x 30 cm、東ソー社) に吸着させ、17 %から24 %のアセトニトリル直線濃度勾配によりMet-76残基型ベータセルリンを溶出した。溶出液を0.02 % トリフルオロ酢酸で透析し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥粉末を蒸留水10 mLで溶解し、酢酸型にしたAG1-X8カラム (1.0 cm x 10 cm、日本バイオラッド社) を通過させた後、再度凍結乾燥を行いMet-76残基型ベータセルリン93 mgを得た。

【0040】

実施例7. ベータセルリン改変体の特徴の決定

実施例3で得られたMet-77残基型ベータセルリン及び実施例6で得られたMet-76残基型ベータセルリンの特徴を以下のように決定した。

a) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を用いた分析

ベータセルリン改変体及び特開平10-191989号に記載の方法により調製したMet-80残基型ベータセルリンをサンプルバッファー (125mM Tris-HCl, 1 % ドデシル硫酸ナトリウム、15% グリセロール、5% 2-メルカプトエタノール、0.005% ブロムフェノールブルー) で懸濁し、マルチゲル15/25 (第一化学薬品) で電気泳動を行った。泳動後のゲルをラピッド CBB KANTO (関東化学社) で染色を行ったところ、いずれもほぼ単一バンドであった。[図1]

b) アミノ酸組成分析

ベータセルリン改変体を4%チオグリコール酸を含む6N塩酸で110℃、24及び48時間気相加水分解を行い、アミノ酸分析計 (日立L-8500 AAmino Acid Analyzer) を用いてアミノ酸組成を決定した。その結果、いずれの改変体も開始コドンATGに由来するメチオニンを含み、cDNA塩基配列から予想されるアミノ酸組成と一致した。[表1、表2]

【表1】

77残基型ベータセルリンのアミノ酸組成分析

	1モル当たりの 残基数	理論値
Asx	7.2	7
Thr	6.0	6
Ser	4.6	5
Glx	9.1	9
Pro	3.9	4
Gly	7.1	7
Ala	4.0	4
Val	3.7	4
Met	0.9	1
Ile	2.0	2
Leu	2.1	2
Tyr	3.0	3
Phe	2.1	2
Lys	5.0	5
His	3.0	2
Arg	6.8	7
Cys	ND	8

【表2】

76残基型ベータセルリンのアミノ酸組成分析

	1モル当たりの 残基数	理論値
Asx	6.2	6
Thr	6.1	6
Ser	5.1	5
Glx	9.4	9
Pro	4.1	4
Gly	7.4	7
Ala	4.1	4
Val	3.8	4
Met	1.0	1
Ile	2.0	2
Leu	2.0	2
Tyr	3.1	3
Phe	2.1	2
Lys	5.0	5
His	2.3	2
Arg	7.1	7
Cys	ND	8

【0041】

c) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列分析を気相プロテインシーケンサー（アプライドバイオシステムズ モデル477A）を用いて決定した。その結果、いずれの改変体もcDNA塩基配列から予想されるアミノ酸組成と一致した。いずれの改変体も80残基型と同様に開始コドンATGに由来するメチオニンをN末端に有していた。[表3、表4]

【表 3】

77残基型ベータセルリンのN末端アミノ酸配列分析

	検出されたPTH- アミノ酸 (pmole)	塩基配列から予 想されるアミノ 酸
1	Met (809)	(Met)
2	Asp (492)	Asp
3	Gly (615)	Gly
4	Asn (425)	Asn
5	Ser (161)	Ser
6	Thr (276)	Thr
7	Arg (253)	Arg
8	Ser (66)	Ser
9	Pro (168)	Pro
10	Glu (127)	Glu

【表 4】

76残基型ベータセルリンのN末端アミノ酸配列分析

	検出されたPTH- アミノ酸 (pmole)	塩基配列から予 想されるアミノ 酸
1	Met (195)	(Met)
2	Asp (213)	Asp
3	Gly (413)	Gly
4	Asn (292)	Asn
5	Ser (99)	Ser
6	Thr (151)	Thr
7	Arg (198)	Arg
8	Ser (54)	Ser
9	Pro (149)	Pro
10	Glu (79)	Glu

【0042】

d) C末端アミノ酸分析

気相ヒドラジン分解法 (100℃、6時間) により、C末端アミノ酸をアミノ酸分析計 (日立 L-8500A Amin Acid Analyzer) を用いて決定した。Met-77 残基型ベータセルリンではアスパラギン酸が、Met-76 残基型ベータセルリンで

はバリンが検出された。[表 5、表 6]

【表 5】

77残基型ベータセルリンのC末端アミノ酸分析

Asp (収率: 32.5 %)

【表 6】

76残基型ベータセルリンのC末端アミノ酸分析

Val (収率: 77.8 %)

【0043】

実施例 8. 3T3細胞を用いた増殖促進活性の測定

モレキュラー・セル・バイオロジー、8、588(1988)に記載のごとく、静止状態の 3T3 A31-714クローン4 (インターナショナル・ジャーナル・オブ・キャンサー、12、463 (1973)) 中への³H-チミジンの取り込みによって増殖促進活性を測定した。

すなわち、5% ウシ血清を含むダルベッコ改変イーグルMEM培地を用いて、1000細胞/mLになるように懸濁した3T3 A31-714クローン4を96ウェルプレートに100 μLづつ播き、炭酸ガスインキュベーター内 (5%炭酸ガス、95%空気) において37℃で1日培養した。上清75 μLを抜き取り、血清を含まないダルベッコ改変イーグルMEM培地を100 μL加える事により血清濃度を1%にした。さらに2日間培養した後、種々の濃度の実施例3で調製したMet-77残基型ベータセルリン、実施例6で調製したMet-76残基型ベータセルリン及び特開平10-191989号に記載の方法により調製したMet-80残基型ベータセルリンを添加した。添加16時間後に³H-チミジン [アマーシャム・ファルマシア・バイオテク] を0.25 μCi/well加え、その4時間後に細胞をPBSで3回洗浄した後、5% SDSを100 μL加え細胞を溶解した。細胞溶解液をシンチレーションバイアルに移し、シンチレーターA (和光純薬社) を1 mL加え、シンチレーションカウンターで³H-チミジンの細胞への取り込みを測定した。[図 2]

【0044】

実施例 9. AR42J細胞を用いた β 細胞分化促進活性の測定

化学発癌剤で誘発された膵臓癌由来細胞株AR42J [Christophe; アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロギー (Am. J. Physiol.), 266: G963 (1994)] を、実施例 3 で調製したMet-77残基型ベータセルリン、実施例 6 で調製したMet-76残基型ベータセルリンまたは特開平10-191989号に記載の方法により調製したMet-80残基型ベータセルリン及び10% ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグルMEM培地を用いて 10^5 細胞/mLになるように懸濁し、500 μ L をチャンバースライドに播き、炭酸ガスインキュベーター内 (5% 炭酸ガス、95% 空気) において37℃で5日間培養した。5日後に細胞をPBSで1回洗浄した後に、10%ホルムアルデヒドで固定し、0.1%トライトンX-100で5分間処理した後に、ブロックエース (雪印、日本) を添加し室温で40分間ブロッキングを行った。10%ブロックエースで希釈した抗インスリン抗体 (アドバンスド・イムノ・ケミカル社) を添加し室温、40分間反応した。0.1%トライトンX-100を添加し室温5分間放置した後、PBSで3回洗浄した。10%ブロックエースで希釈したFITC (Fluorescein Isothiocyanate) 標識抗マウスIgG抗体 (カッペル社) を添加し、室温で40分間反応した。0.1%トライトンX-100を添加し室温5分間放置した後、PBSで3回洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。いずれのベータセルリンを添加した場合においても、蛍光染色された細胞、すなわちインスリンを産生する β 細胞に分化した細胞が観察された。[図3]

【0045】

実施例 10. ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ遺伝子発現ベクターの構築

β 細胞への分化促進活性はインスリンプロモーターの下流にレポーターとしてアルカリフォスファターゼを連結したものにより形質転換されたAR42J細胞を用いても実施した。すなわちベータセルリンにより β 細胞へと分化した細胞はアルカリフォスファターゼを産生し、このアルカリフォスファターゼの活性を測定することにより β 細胞への分化促進活性を定量的に測定することが可能である。

ラット尾から常法に従ってゲノムDNAを調製した。このDNAをテンプレートとして、既報のラットインスリンII遺伝子プロモーターの塩基配列 (GenBank:Ac

cession No. J00748) をもとに合成したプライマー R I - 1 [5'-AGAGTCAAGGATC
CCCCAACCACT-3'] および R I - 3 [5'-AGCTGGTCACTTAGGGCTGGGG-3'] を用いて P
C R 法によりインスリンプロモーター領域 0.75 Kb を増幅した。さらに、この P
C R 産物をテンプレートとしてプライマー R I - 1 C l a [5'-GAATCGATAGAGTCA
AGGATCCCCCA-3'] および R I - 3 X h o [5'-GACTCGAGCTGGTCACTTAGGG-3'] を用
いて P C R を行った。増幅された 0.75 Kb DNA 断片を単離し、p T 7 B l u e ベ
クター (Novagen 69820-1) に組み込んで得られたプラスミド p T B 1 8 8 1 を
用いてクローニングされた断片の塩基配列を決定し、ラットインスリンプロモ
ーターであることを確認した。プラスミド p T B 1 8 8 1 を Xho I-Cla I で切断し
てラットインスリンプロモーターである 0.73 kb DNA 断片を得た。次にヒト胎盤
アルカリフォスファターゼ (P L A P) をコードする 2.0 kb cDNA (J. Berger ら
、Gene 66, 1(1988)の発現プラスミド p T B 1 3 3 0 を Xho I-HindIII で切断し
て得られた 2.7 kb DNA 断片 (PLAP cDNA、SV40 由来スプライシング部位およびポ
リ A 付加部位、pBR322 由来 ori およびアンピシリン耐性遺伝子を含む) を単離し
、前述のラットインシュリンプロモーター領域 0.73 kb Xho I-Cla I 断片を T4 DN
A リガーゼ反応によって連結してプラスミド p T B 1 8 9 8 を得た。

【0046】

実施例 11. PLAP 発現 AR42J 細胞の構築

AR42J 細胞に P L A P 発現プラスミド p T B 1 8 9 8 と Tn5 の neor 遺伝子を含むプ
ラスミド pMCneopoly A (STRATAGENE) をトランスフェクション試薬 TransITTM-LT
1 (Mirus, PenVera Corporation) を用いて同時に導入した。導入後の細胞は 10%
牛胎児血清を加えた DMEM で 2 日間培養した後、G418 (ゲネテシン、GIBCO BR
L) 800 μ g/mL を添加した選択培地に加えて培養を続けた。G418 耐性となって生
育した細胞を限界希釈法によりクローンを単離した。

各クローンの細胞を 24 穴プレートに播き、Met-80 残基型ベータセルリンを 20 n
g/mL 添加および無添加で 4 日間培養し、培養上清を集めて 65℃ 30 分間熱処理
を行った後、培地中のアルカリフォスファターゼ活性を測定した。80 残基型ベ
ータセルリン添加時にアルカリフォスファターゼ活性の上昇が認められるクロー
ンを選択した。いくつかのクローンの結果を以下の表 7 に示す。

【表7】

クローン	PLAP活性 (A 405)	
	BTC無添加	BTC添加
AR1898-033	0.034	0.366
AR1898-053	0.008	0.089
AR1898-0192	0.077	0.752

【0047】

実施例12. PLAP発現AR42J細胞を用いた β 細胞分化促進活性の測定

実施例11で構築したPLAP発現AR42J細胞を、各種濃度の実施例3で調製したMet-77残基型ベータセルリン、実施例6で調製したMet-76残基型ベータセルリンまたは特開平10-191989号に記載の方法により調製したMet-80残基型ベータセルリン及び10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグルMEM培地を用いて 10^5 細胞/mLになるように懸濁し、100 μ Lを96ウェルプレートに播き、炭酸ガスインキュベーター内（5%炭酸ガス、95%空気）において37℃で5日間培養した。5日後に培養上清をサンプリングし、65℃で30分間処理した後、50 μ Lをあらかじめ50 μ Lの2XSEAP（2Mジエタノールアミン、1mM $MgCl_2$ 、20mMホモアルギニン）を添加した96ウェルマイクロプレートに加えた。37℃で10分間保った後、20 mg/mLのp-ニトロフェニルリン酸（シグマ社）を10 μ L添加し37℃で16時間反応を行った【図4】。Met-77残基型ベータセルリンおよびMet-76残基型ベータセルリンはMet-80残基型ベータセルリンとほぼ同じ分化誘導促進活性を示した。

【0048】

【配列表】

【配列番号：1】

配列の長さ：77

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys
 20 25 30
 Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
 35 40 45
 Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys
 50 55 60
 Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp
 65 70 75

【0049】

【配列番号：2】

配列の長さ：76

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys
 20 25 30
 Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
 35 40 45
 Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys
 50 55 60
 Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val
 65 70 75

【0050】

【配列番号：3】

配列の長さ：47

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

1 5 10 15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys

20 25 30

Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp

35 40 45

【0051】

【配列番号：4】

配列の長さ：46

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

1 5 10 15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys

20 25 30

Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val

35 40 45

【0052】

【配列番号：5】

配列の長さ：79

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp	Gly	Asn	Ser	Thr	Arg	Ser	Pro	Glu	Thr	Asn	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5						10				15	
Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	Cys	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Gln	Ser	Lys	Arg	Lys
			20						25					30	
Gly	His	Phe	Ser	Arg	Cys	Pro	Lys	Gln	Tyr	Lys	His	Tyr	Cys	Ile	Lys
		35					40						45		
Gly	Arg	Cys	Arg	Phe	Val	Val	Ala	Glu	Gln	Thr	Pro	Ser	Cys	Val	Cys
	50					55					60				
Asp	Glu	Gly	Tyr	Ile	Gly	Ala	Arg	Cys	Glu	Arg	Val	Leu	Phe	Tyr	
65					70						75				

【0053】

【配列番号：6】

配列の長さ：78

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp	Gly	Asn	Ser	Thr	Arg	Ser	Pro	Glu	Thr	Asn	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5						10				15	
Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	Cys	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Gln	Ser	Lys	Arg	Lys
			20						25					30	
Gly	His	Phe	Ser	Arg	Cys	Pro	Lys	Gln	Tyr	Lys	His	Tyr	Cys	Ile	Lys
		35					40						45		
Gly	Arg	Cys	Arg	Phe	Val	Val	Ala	Glu	Gln	Thr	Pr	Ser	Cys	Val	Cys
	50					55					60				

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe

65

70

75

【0054】

【配列番号：7】

配列の長さ：77

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly

1

5

10

15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

20

25

30

Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

35

40

45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys

50

55

60

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu

65

70

75

【0055】

【配列番号：8】

配列の長さ：79

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly

1

5

10

15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

	20		25		30										
Gly	His	Phe	Ser	Arg	Cys	Pro	Lys	Gln	Tyr	Lys	His	Tyr	Cys	Ile	Lys
	35		40		45										
Gly	Arg	Cys	Arg	Phe	Val	Val	Ala	Glu	Gln	Thr	Pro	Ser	Cys	Val	Cys
	50		55		60										
Asp	Glu	Gly	Tyr	Ile	Gly	Ala	Arg	Cys	Glu	Arg	Val	Asp	Phe	Tyr	
65			70		75										

【0056】

【配列番号：9】

配列の長さ：78

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp	Gly	Asn	Ser	Thr	Arg	Ser	Pro	Glu	Thr	Asn	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly
1		5		10		15									
Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	Cys	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Gln	Ser	Lys	Arg	Lys
	20		25		30										
Gly	His	Phe	Ser	Arg	Cys	Pro	Lys	Gln	Tyr	Lys	His	Tyr	Cys	Ile	Lys
	35		40		45										
Gly	Arg	Cys	Arg	Phe	Val	Val	Ala	Glu	Gln	Thr	Pro	Ser	Cys	Val	Cys
	50		55		60										
Asp	Glu	Gly	Tyr	Ile	Gly	Ala	Arg	Cys	Glu	Arg	Val	Asp	Phe		
65			70		75										

【0057】

【配列番号：10】

配列の長さ：49

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

1 5 10 15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys

20 25 30

Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe

35 40 45

Tyr

【0058】

【配列番号：11】

配列の長さ：48

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

1 5 10 15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys

20 25 30

Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe

35 40 45

【0059】

【配列番号：12】

配列の長さ：47

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

1 5 10 15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys

20 25 30

Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu

35 40 45

【0060】

【配列番号：13】

配列の長さ：49

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

1 5 10 15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys

20 25 30

Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe

35 40 45

Tyr

【0061】

【配列番号：14】

配列の長さ：48

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pr Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

1 5 10 15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys

20

25

30

Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe

35

40

45

【0062】

【配列番号：15】

配列の長さ：231

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60
AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120
CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180
TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA C 231

【配列番号：16】

配列の長さ：228

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60
AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120
CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180
TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTT 228

【配列番号：17】

配列の長さ：141

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

```
CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA 120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA C 141
```

【配列番号：18】

配列の長さ：138

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

```
CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA 120
GCAAGGTGTG AGAGAGTT 138
```

【配列番号：19】

配列の長さ：237

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60
 AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120
 CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180
 TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT GTTTTAC 237

【配列番号：20】

配列の長さ：234

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60
 AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120
 CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180
 TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT GTTT 234

【配列番号：21】

配列の長さ：231

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60
 AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120
 CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180
 TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT G 231

【配列番号：2 2】

配列の長さ：2 3 7

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

特徴を決定した方法：S

配列

```
GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60
AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120
CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180
TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA CTTTAC 237
```

【配列番号：2 3】

配列の長さ：2 3 4

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

特徴を決定した方法：S

配列

```
GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60
AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120
CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180
TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA CTTT 234
```

【配列番号：2 4】

配列の長さ：1 4 7

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

```
CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA 120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT GTTTTAC 147
```

【配列番号：25】

配列の長さ：144

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

```
CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA 120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT GTTT 144
```

【配列番号：26】

配列の長さ：141

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

```
CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA 120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT G 141
```


【配列番号：27】

配列の長さ：147

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

```
CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA 120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA CTTTAC 147
```

【配列番号：28】

配列の長さ：144

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

```
CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA 120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA CTTT 144
```

【0063】

【配列番号：29】

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CATATGGATG GGAATTCCAC CAGAAGTCCT G

31

【配列番号：30】

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGATCCCTAG TCAACTCTCT CACACCTTGC TCC

33

【配列番号：31】

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGAGTCAAGG ATCCCCCAAC CACT

24

【配列番号：32】

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGCTGGTCAC TTAGGGCTGG GG

22

【配列番号：33】

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GAATCGATAG AGTCAAGGAT CCCCCA

26

【配列番号：34】

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GACTCGAGCT GGTCACCTTAG GG

22

【配列番号：35】

配列の長さ：80

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

20 25 30

Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

35 40 45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pr Ser Cys Val Cys

50 55 60

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr

65 70 75 80

【配列番号：36】

配列の長さ：240

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

```
GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60
AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120
CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180
TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA CTTGTTTTAC 240
```

【0064】

【発明の効果】

本発明のベータセルリンムテインまたはその塩は、BTC活性を保持したまま、EGF活性が減弱されており、抗原性の問題もないことから、優れた糖尿病治療薬として有用である。

【0065】

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例7で行われたベータセルリンムテイン（改変体）の電気泳動の結果を示す図を示す。

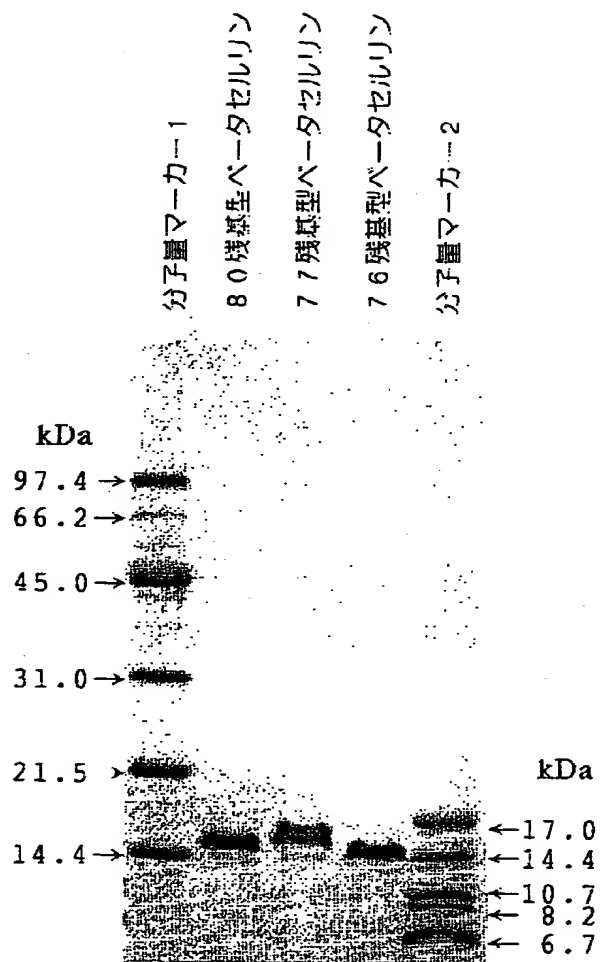
【図2】実施例8で行われた³H-チミジンの細胞への取り込み結果を示す図を示す。

【図3】実施例9に記載のβ細胞に分化した細胞に関する蛍光顕微鏡写真図を示す。

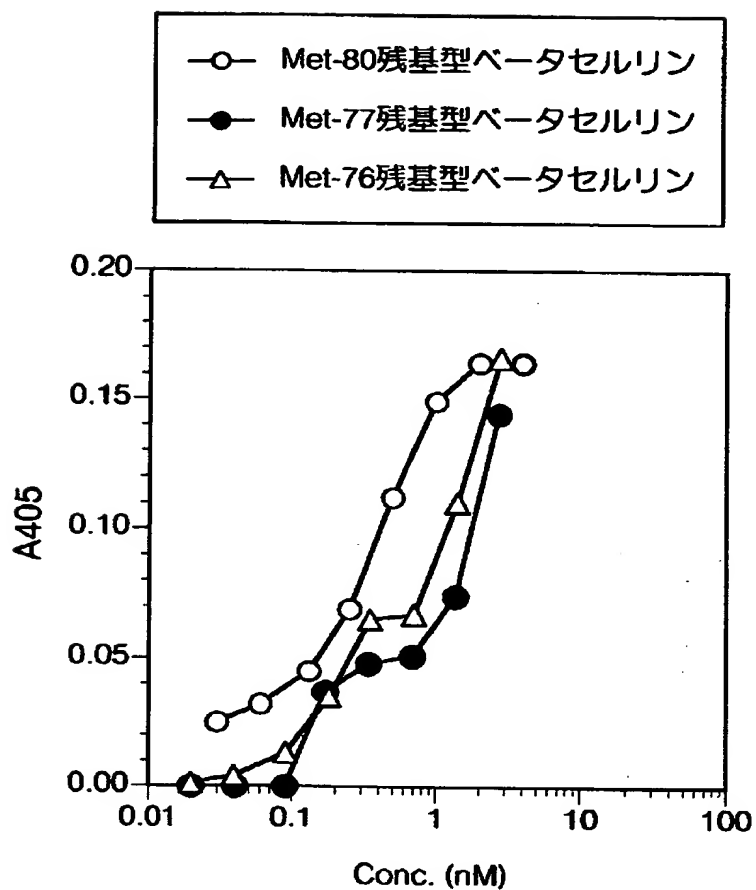
【図4】実施例12で行われたβ細胞分化促進活性の結果を示す図を示す。

【書類名】図面

【図1】



【図 4】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】優れた糖尿病治療薬の提供。

【解決手段】

ベータセルリンのN末端から1ないし40個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から1ないし4番目のアミノ酸残基において、C末端から3番目のアミノ酸残基LeuもしくはC末端から4番目のアミノ酸残基Aspを含む1ないし4個のアミノ酸残基が欠失または他のアミノ酸残基もしくは他のペプチド鎖に置換されたベータセルリンムテインまたはその塩。

【効果】本発明のベータセルリンムテインまたはその塩は、BTC活性を保持したまま、EGF活性が減弱されており、抗原性の問題もないことから、優れた糖尿病治療薬として有用である。

【選択図】なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100073955

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目17番85号

武田薬品工業株式会社 大阪工場内

【氏名又は名称】 内山 務

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日 1992年 1月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

氏 名 武田薬品工業株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)



#10

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, the undersigned Masaaki Iwabuchi, translator, having an office at Abe, Ikubo & Katayama, 2-8-7, Yaesu, Chuo-ku, Tokyo, Japan, declare that I am well acquainted with the Japanese and English languages, and that the attached English text is, to the best of my knowledge, a complete and accurate translation from the Japanese text of the priority document, Japanese Patent Application No. ¹⁰(1998)-350377 (Ref. No. A98223) dated December 9, 1998.

The undersigned further declares that all statements made herein of his/her own knowledge are true, and all statements made on information and belief are believed to be true, and that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like, so made, are punishable by fine and/or imprisonment under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that any such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent resulting therefrom.

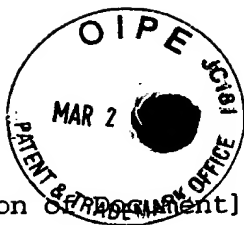
Date: February 13, 2002

Masaaki Iwabuchi
Signature of Translator

Masaaki Iwabuchi
Printed Name of Translator



THIS PAGE BLANK (USPTO)



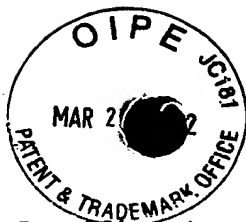
H10-350377

[Designation of Patent] Patent Application
[Reference Number] A98223
[Filing Date] December 9, 1998
[Address] Commissioner of the Patent Office
[International Classification] C12N 15/12
C07K 13/00
[Title of the Invention] BETACELLULIN MUTEIN
[Number of Claim(s)] 7
[Inventor]
[Address] 10-101-2003, Koyochonaka 1-chome, Higashinada-ku,
Kobe-shi, HYOGO
[Name] ITO Takashi
[Inventor]
[Address] 3, Honjo-nakanomachi 10-chome, Gifu-shi, Gifu
[Name] NAKAYAMA Mitsuyo
[Inventor]
[Address] 80-50, Tanabeyuden, Kyotanabe-shi, KYOTO
[Name] TANAKA Yoko
[Inventor]
[Address] 1-12-E502, Matsuodai 2-chome, Inagawa-cho, Kawabe-gun,
HYOGO
[Name] KOBAYASHI Masayuki
[Inventor]
[Address] 66-3, Shimogamo-miyazakicho, Sakyo-ku, Kyoto-shi,
KYOTO
[Name] IGARASHI Koichi
[Inventor]
[Address] 54-16, Daiwanishi 1-chome, Kawanishi-shi, HYOGO
[Name] NISHIMURA Osamu
[Applicant for patent]
[Identification Number] 000002934
[Name Person or Legal Person] TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
[Representative] TAKEDA Kunio
[Attorney]
[Identification Number] 100073955
[Patent Attorney]
[Name Person or Legal Person] ASAHINA Tadao
[Appointed Attorney]
[Identification Number] 100110456
[Patent Attorney]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Name Person or Legal Person]	UCHIYAMA Tsutomu	
[Details of Commission]		
[Prepayment Register Number]	005142	
[Amount of Payment]	21000	
[List of What It Submitted]		
[Name of What Is Submitted]	Specification	1
[Name of What Is Submitted]	Drawings	1
[Name of What Is Submitted]	Abstract	1
[General Power of Attorney]	9000053	
[General Power of Attorney]	9721047	
[Request of Proof]	Yes	

THIS PAGE BLANK (USPTO)



H10-350377

[Document] Specification

[Title of the Invention] Betacellulin Muteins

[Claims]

[Claim 1] A betacellulin mutein or salt thereof, wherein 1 to 40 amino acid residues from the N terminal of the betacellulin may be deleted, and 1 to 4 amino acid residues of the first through fourth amino acid residues from the C terminal, including the Leu at 3 from the C terminal and the Asp at 4 from the C terminal, may be deleted or substituted with other amino acid residues or other peptide chains.

[Claim 2] A betacellulin mutein or salt thereof according to Claim 1, wherein 1 to 40 amino acid residues from the N terminal have been deleted.

[Claim 3] A betacellulin mutein or salt thereof according to Claim 1, comprising (1) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, (2) an amino acid sequence in which 1 to 40 amino acids from the N terminal in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 have been deleted, (3) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, or (4) an amino acid sequence in which 1 to 40 amino acids from the N terminal in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 have been deleted.

[Claim 4] A betacellulin mutein or salt thereof according to Claim 1, comprising (1) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, (2) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, (3) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3, or (4) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 4.

[Claim 5] A method for manufacturing a betacellulin mutein or salt thereof according to Claim 1, characterized by culturing the transformants which have been transformed with recombinant vectors containing DNA encoding the betacellulin mutein according to Claim 1 to produce said betacellulin mutein.

[Claim 6] A pharmaceutical composition comprising a betacellulin mutein or salt thereof according to Claim 1.

[Claim 7] A method for prophylaxis or treatment for diabetes, comprising a betacellulin mutein or salt thereof according to Claim 1.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Technical Field to which the Invention pertains]

The present invention relates to muteins (hereinafter, sometimes to be referred to as mutated protein) with less growth promoting activity (EGF activity) for smooth muscle cells while preserving



THIS PAGE BLANK (USPTO)

activity in differentiating betacellulin into pancreatic β cells (BTC activity), as well as a manufacturing method thereof, etc.

[0002]

[Prior Art]

Human betacellulin is a protein factor consisting of 80 amino acids excised from a precursor consisting of 178 amino acids. The entire amino acid sequence has been identified (Sasada et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190:1173 (1993)). Betacellulin was first discovered as a factor having mouse 3T3 cell growth promoting activity, and has subsequently been found to have vascular smooth muscle cell and retinal pigment epithelial cell growth promoting activity (EGF activity) (Shing et al, *Science*, 259:1604 (1993)). It has been found that betacellulin also acts on pancreatic undifferentiated cells, promoting their differentiation to pancreatic β cells which produce insulin (BTC activity) (Mashima et al, *J. Clinic. Invest.*, 97:1647 (1996)).

Since betacellulin has differentiation promoting activity to pancreatic β cells which produce insulin, it is thus considered to be a potentially useful as prophylactic and therapeutic agent for diabetes (such as insulin-dependent diabetes) as well as pancreatic dysfunction and the like associated with diabetes (Miyagawa et al, Abstracts of the 1997 Japan Diabetes Association Conference, 125).

[0003]

[Problem to be solved by the Invention]

However, since betacellulin has such vascular smooth muscle cell and retinal pigment epithelial cell growth promoting activity, these activities have proven to be a problem in applications as a therapeutic agent for diabetes.

The potential of such pharmaceuticals could therefore be improved if the growth promoting activity of the vascular smooth muscle cells and the like could be reduced while preserving the action in promoting pancreatic β cell differentiation, but no such betacellulin muteins are thus far known.

[0004]

[Means for solving a problem]

As a result of extensive research on betacellulin muteins, the inventors perfected the present invention upon the discovery and further research of muteins in which betacellulin mutations allowed the smooth vascular muscle growth promoting activity and the like to be reduced while preserving the pancreatic β cell differentiation

THIS PAGE BLANK (USE)

promoting activity, with no antigenicity-related problems when administered to the living body. That is, the present invention relates to betacellulin muteins, a method for obtaining said muteins and the like.

[0005]

That is, the present invention relates to:

- (1) A betacellulin mutein or salt thereof, wherein 1 to 40 amino acid residues from the N terminal of the betacellulin may be deleted, and 1 to 4 of the first through fourth amino acid residues from the C terminal, including the Leu at 3 from the C terminal and the Asp at 4 from the C terminal, may be deleted or substituted with other amino acid residues or other peptide chains;
- (2) A betacellulin mutein or salt thereof according to (1) above, wherein 1 to 40 amino acid residues from the N terminal have been deleted;
- (3) A betacellulin mutein or salt thereof according to (1) above, comprising 1) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, 2) an amino acid sequence in which 1 to 40 amino acids from the N terminal in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 have been deleted, 3) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, or 4) an amino acid sequence in which 1 to 40 amino acids from the N terminal in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 have been deleted;
- (4) A betacellulin or salt thereof according to (1) above, comprising 1) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, 2) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, 3) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3, or 4) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 4;
- (5) A method for manufacturing a betacellulin or salt thereof according to (1) above, characterized by culturing the transformants which have been transformed with recombinant vectors containing DNA encoding the betacellulin according to (1) above to produce said betacellulin mutein;
- (6) A pharmaceutical composition comprising a betacellulin or salt thereof according to (1) above.
- (7) A prophylactic or therapeutic drug for diabetes, comprising a betacellulin or salt thereof according to (1) above.

[0006]

[Mode for Carrying Out The Invention]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

As described above, the betacellulin muteins of the present invention have reduced or attenuated EGF activity while preserving intact BTC activity.

Specific examples of betacellulin muteins with reduced EGF activity and intact BTC activity of the present invention include betacellulin muteins, or their salts, in which 1 to 40 amino acid residues may be deleted from the N terminal of the betacellulin, and 1 to 4 amino acid residues of the first through fourth amino acid residues from the C terminal, including the Leu at 3 from the C terminal and the Asp at 4 from the C terminal, may be deleted or substituted with other amino acid residues or other peptide chains. More specific examples include the aforementioned betacellulin muteins or the like in which 1 to 40 amino acid residues have been deleted from the N terminal.

As used herein, betacellulin means a polypeptide having the amino acid sequence represented by the following, SEQ ID NO: 35, as described in Sasada et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190:1173 (1993)).

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser
Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val
Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg
Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr

The aforementioned "substitution by other amino acid residues or peptide chains" mentioned in the expression "betacellulin muteins in which residues are substituted with other amino acid residues or other peptide chains" may refer to any type of amino acid residue or peptide chain, provided that the substitution does not compromise the characteristic feature of the betacellulin mutein which results in "reduced EGF activity and intact BTC activity and does not occur the antigenicity-related problem at the administration of said betacellulin into living body." Specific examples of "other amino acids" above can be selected from other amino acids among the class to which amino acid of said amino acid sequence pertains. For example, nonpolar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan, and methionine. Polar (neutral) amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine. Amino acids with a positive charge (basic) include arginine, lysine, and histidine. Amino acids with a negative

THIS PAGE BLANK (USPTO)

charge (acidic) include aspartic acid and glutamic acid. Specific examples of the "other peptide chains" above refer to peptide chains of two or more "other amino acids" bound together, and preferably includes peptide chains consisting of 2 to 4 amino acid residues.

[0007]

The following are specific examples of "betacellulin muteins in which 1 to 40 amino acid residues may be deleted from the N terminal of the betacellulin, and 1 to 4 amino acid residues of the first through fourth amino acid residues from the C terminal, including the Leu at 3 from the C terminal and the Asp at 4 from the C terminal, may be deleted or substituted with other amino acid residues or other peptide chains."

(1) Betacellulin muteins having the following amino acid sequence up to the 76th position from the N terminal of betacellulin,

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser
Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val
Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg
Cys Glu Arg Val

where 1 to 4 amino acid residues of the first through fourth amino acid residues (Asp Leu Phe Tyr) from the C terminal, including the Leu at 3 from the C terminal and the Asp at 4 from the C terminal, has been deleted or substituted with other amino acid residues or other peptide chains, such as ((1)) betacellulin muteins having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2:

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser
Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val
Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg
Cys Glu Arg Val

((2)) betacellulin muteins having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1:

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser
Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg
Cys Glu Arg Val Asp

((3)) betacellulin muteins having the amino acid sequence represented
by SEQ ID NO: 5:

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser
Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val
Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg
Cys Glu Arg Val Leu Phe Tyr

((4)) betacellulin muteins having the amino acid sequence represented
by SEQ ID NO: 6:

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser
Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val
Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg
Cys Glu Arg Val Leu Phe

((5)) betacellulin muteins having the amino acid sequence represented
by SEQ ID NO: 7:

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser
Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val
Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg
Cys Glu Arg Val Leu

((6)) betacellulin muteins having the amino acid sequence represented
by SEQ ID NO: 8:

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser
Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val
Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg
Cys Glu Arg Val Asp Phe Tyr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

((7)) betacellulin muteins having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9:

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser
Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val
Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg
Cys Glu Arg Val Asp Phe

((8)) betacellulin muteins in which the amino acid residue at 3 (Leu) from the C terminal of betacellulin is substituted with another amino acid residue.

Of the above, betacellulin muteins comprising the amino acid sequences represented by SEQ ID NO: 1 or betacellulin muteins represented by SEQ ID NO: 2 are particularly preferred.

[0008]

(2) Betacellulin proteins in which the 1st to 40th amino acid residues may be deleted from the N terminal of betacellulin

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser
Arg Cys Pro Lys

the mutein has the following amino acid sequence from the 41st through 76th residues from the N terminal

Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln
Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val

and 1 to 4 amino acid residues of the first through fourth amino acid residues (Asp Leu Phe Tyr) from the C terminal, including the Leu at 3 from the C terminal and the Asp at 4 from the C terminal, are deleted or substituted with other amino acid residues or other peptide chains, preferably betacellulin muteins in which the 1st to 37th amino acid residues from the N terminal of betacellulin may be deleted

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser
Arg

THIS PAGE BLANK (USPTO)

the mutein has the following amino acid sequence from the 38th through 76th residues from the N terminal

Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val
Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys
Glu Arg Val

and 1 to 4 amino acid residues of the first through fourth amino acid residues (Asp Leu Phe Tyr) from the C terminal, including the Leu at 3 from the C terminal and the Asp at 4 from the C terminal, are deleted or substituted with other amino acid residues or other peptide chains preferably,

((1)) betacellulin muteins having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 4:

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu
Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val

((2)) betacellulin muteins having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3:

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu
Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp

((3)) betacellulin muteins having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 10:

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu
Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe Tyr

((4)) betacellulin muteins having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 11:

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu
Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe



THIS PAGE BLANK (USPTO)

((5)) betacellulin muteins having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 12:

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu
Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu

((6)) betacellulin muteins having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 13:

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu
Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe Tyr

((7)) betacellulin muteins having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 14:

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu
Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe

((8)) betacellulin muteins in which the 3rd amino acid residue from the C terminal (Leu) in partial peptides represented by the amino acid sequence from 31 through 80 of the N terminal of betacellulin is substituted with another amino acid residue.

Preferred among these are betacellulin muteins with amino acid sequences represented by SEQ ID NOs: 3 or 4.

[0009]

Among the preferred examples of betacellulin muteins of the present invention given in (1) and (2) above, especially preferable examples include betacellulin muteins with ((1)) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, ((2)) an amino acid sequence in which 1 through 40 amino acids from the N terminal have been deleted in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, ((3)) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, or ((4)) an amino acid sequence in which 1 through 40 amino acids from the N terminal have been deleted in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2.

Especially preferable are betacellulin muteins with ((1)) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, ((2)) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, ((3)) an amino acid sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

represented by SEQ ID NO: 3, or ((4)) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 4.

[0010]

In accordance with the conventional manner for designating peptides, the left terminal of the betacellulin muteins in the present Specification is referred to as the N terminal (amino terminal), and the right terminal is referred to as the C terminal (carboxyl terminal). The C terminal of these betacellulin muteins is usually a carboxyl group (-COOH) or carboxylate (-COO⁻), but the C terminal may also be an amide (-CONH₂) or ester (-COOR). Examples of R in such esters include C₁₋₆ alkyl groups such as methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, or n-butyl, C₃₋₈ cycloalkyl groups such as cyclopentyl and cyclohexyl, C₆₋₁₂ aryl groups such as phenyl and α -naphthyl, phenyl-C₁₋₂ alkyls such as benzyl, phenethyl, and benzhydryl, or C₇₋₁₄ aralkyl groups such as α -naphthyl-C₁₋₂ alkyls such as α -naphthylmethyl, and pivaloyloxymethyl groups, which is used as an ester for oral administration.

Examples of salts of the betacellulin muteins of the present invention include salts with physiologically acceptable bases (e.g., alkali metals) or acids (organic and inorganic acids), in particular physiologically acceptable acid salts are preferred. Examples of such salts include salts with inorganic acids (e.g., hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, and sulfuric acid), and acids with organic acids (e.g., acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methanesulfonic acid, and benzenesulfonic acid).

[0011]

The betacellulin muteins of the present invention can be prepared by genetic engineering as described in Japanese Unexamined Patent Application (Kokai) H6-87894, for example, or by a protease treatment that is publicly known, preferably a carboxypeptidase treatment, and even more preferably bovine pancreatic carboxypeptidase A treatment, of betacellulin obtained by the culture of beta tumor cells. They can also be prepared according to the peptide synthesis described below. They can furthermore be manufactured by the culture of transformants containing DNA encoding betacellulin muteins, as described below.

When the betacellulin is manufactured from human or mammalian tissue or cells, the human or mammalian tissue or cells should be homogenized and then extracted with acid or the like, and the extract should be purified and isolated through a combination of salting out,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

dialysis, gel filtration, and chromatography such as reverse phase chromatography, ion exchange chromatography, and affinity chromatography.

[0012]

Peptides may be synthesized by either solid phase synthesis or liquid phase synthesis, for example. That is, partial peptides or amino acids capable of composing the betacellulin muteins of the present invention are condensed with the remainder, and protection groups are eliminated when the product has protection groups, whereby the target betacellulin mutein can be manufactured. The publicly known methods for condensation and the removal of protection groups include the following methods in (1) through (5).

(1) M. Bodanszky and M.A. Ondetti, *Peptide Synthesis*, Interscience Publishers, New York (1966)

(2) Schroeder and Luebke, *The Peptide*, Academic Press, New York (1965)

(3) Nobuo Izumiya et al, *Peptide Synthesis Fundamentals and Experiments*, Maruzen (1975)

(4) Jimei Yashima and Toshihira Kashiwahara, *Basic Biochemical Experiments*, Vol. 1, Protein Chemistry IV, 205 (1977)

(5) *Sequel Development of Medical Drugs*, Vol. 14, *Peptide Synthesis*, Kadokawa Shoten, Ed. Jimei Yashima

After the reaction, the polypeptide of the present invention can be purified and isolated by a combination with, for example, solvent extraction, distillation, column chromatography, liquid chromatography, and recrystallization. When the resulting polypeptide is in free form, it can be converted to a suitable salt by a publicly known method. Alternatively, when a salt form is obtained, it can be converted to free form by a publicly known method.

[0013]

Commercially available peptide binding resins suitable for amide formation can be used for amide forms of betacellulin. Examples of such resins include chloromethyl resins, hydroxymethyl resins, benzhydrylamine resins, aminomethyl resins, 4-benzyloxybenzyl alcohol resins, 4-methylbenzhydrylamine resins, PAM resins, 4-hydroxymethyl methylphenyl acetamide methyl resins, polyacrylamide resins, 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-hydroxymethyl)phenoxy resins, and 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc aminoethyl)phenoxy resins. Such resins can be used for the condensation of amino acids with suitably protected side chain functional groups and α -amino groups on resin in accordance with

THIS PAGE BLANK (USPTO)

various publicly known methods of condensation as befits the sequence of the intended peptide. After the reaction, the peptide is excised from the resin, the various protection groups are simultaneously removed, and a reaction for forming intramolecular disulfide bonds is brought about in a highly diluted solution as needed to obtain the target amide forms.

Although various activating reagents that can be used for peptide synthesis may be used for the condensation of such protected amino acids, carbodiimides are particularly preferred. Examples of carbodiimides include DCC, N,N'-diisopropylcarbodiimide, and N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide. For activation with the above, racemization inhibitors (e.g., HOBT and HOOBT) and protected amino acids can be added directly to the resin, or they can be added in the form of corresponding acid anhydrides or HOBT esters or HOOBT esters to the resin after the activation of the protected amino acids. Solvents which are used for the condensation with resins or the activation of protected amino acids can be suitably selected from solvents which are known to be capable of being used for peptide condensation. Examples include acid amides such as N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide, and N-methylpyrrolidone, halogenated hydrocarbons such as methylene chloride and chloroform, alcohols such as trifluoroethanol, sulfoxides such as dimethylsulfoxide, tertiary amines such as pyridine, ethers such as dioxane and tetrahydrofuran, nitriles such as acetonitrile and propionitrile, esters such as methyl acetate and ethyl acetate, and suitable mixtures of the above. The reaction temperature can be suitably selected from within the known usable range in the formation of peptide bonds, which is usually about -20 to 50°C. Activated amino acid derivatives are usually used in an excess amount of 1.5 to 4 folds. When ninhydrin reaction tests reveal insufficient condensation, the condensation is repeated without removing the protection groups until sufficient condensation has been achieved. When repeated reaction fails to provide sufficient condensation, acetic acid anhydride or acetyl imidazole may be used for the acetylation of the unreacted amino acids to avoid influencing subsequent reactions.

Examples of protection groups for the amino groups of starting material amino acids include Z, Boc, tertiary-pentyloxycarbonyl, isobornyloxycarbonyl, 4-methoxybenzyloxycarbonyl, Cl-Z, Br-Z, adamantyloxycarbonyl, trifluoroacetyl, phthaloyl, formyl, 2-nitrophenylsulfenyl, diphenylphosphinothioyl, and Fmoc. Examples of protection groups for carboxyl groups include those in which R is a C₁₋₆

THIS PAGE BLANK (USPTO)

alkyl group, C₃₋₈ cycloalkyl group, or C₇₋₁₄ aralkyl group, as well as 2-adamantyl, 4-nitrobenzyl, 4-methoxybenzyl, and 4-chlorobenzyl, phenacyl groups, and benzyloxycarbonylhydrazide, tertiary-butoxycarbonylhydrazide, and tritylhydrazide.

The hydroxyl groups of serine and threonine can be protected, for example, by esterification or etherification. Examples of groups that are suitable for esterification include lower alkanoyl groups such as acetyl, allyl groups such as benzoyl, and carbon-derived groups such as benzyloxycarbonyl and ethoxycarbonyl. Examples of groups that are suitable for etherification include benzyl, tetrahydropyranyl, and tertiary-butyl groups.

Examples of protection groups for phenolic hydroxyl groups of tyrosine include Bzl, Cl₂-Bzl, 2-nitrobenzyl, Br-Z, and tertiary-butyl.

Examples of protection groups for imidazoles of histidine include Tos, 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl, DNP, benzyloxymethyl, Bum, Boc, Trt, and Fmoc.

Examples for activated carboxyl groups in the starting material include corresponding acid anhydrides, azides, and active esters (esters with alcohols (e.g., pentachlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, 2,4-dinitrophenol, cyanomethyl alcohol, para-nitrophenol, HONB, N-hydroxysuccinimide, N-hydroxyphthalimide, and HOBt)). Examples for activated amino groups in the starting material include the corresponding phosphoric amides.

[0014]

Methods for removing (eliminating) protection groups include direct contact reduction in a hydrogen flow in the presence of a catalyst such as Pd black or Pd carbon, acid treatment with anhydrous hydrogen fluoride, methanesulfonic acid, trifluoromethanesulfonic acid, trifluoroacetic acid, or mixtures thereof, base treatment with diisopropylethylamine, triethylamine, piperidine, or piperazine, or reduction with sodium in liquid ammonia. The eliminating reaction by acid treatment above performed at a temperature of -20 to 40°C, but it is effective to add a cation scavenger such as anisol, phenol, thioanisol, meta-cresol, para-cresol, dimethylsulfide, 1,4-butanedithiol, or 1,2-ethanedithiol. 2,4-dinitrophenyl used as an imidazole protection group for histidine can be removed by treatment with thiophenol, while formyl groups used as indole protection groups for tryptophan can be removed by acid treatment in the presence of the aforementioned 1,2-ethanediol, 1,4-butanedithiol, or the like, and can

THIS PAGE BLANK (USPTO)

also be removed by alkali treatment with diluted sodium hydroxide, diluted ammonia, or the like.

Methods for introducing protection groups to functional groups which are not to be involved in the reaction and the protection groups, the elimination of such protection groups, the activation of functional groups involved in the reaction, and the like should be managed by publicly known methods or modification thereof.

In another method for obtaining an amide form, the α -carboxyl group of the carboxyl terminal amino acid is first amidated, the peptide chain is then extended to the desired length to the amino group side, a peptide except for only the protection groups for the α -amino groups on the N terminal of the peptide chain and a peptide (or amino acid) except for only the protection groups for the carboxyl groups on the C terminal are then prepared, and the two peptides are allowed to undergo condensation in a solvent mixture such as the above. The details of the condensation are the same as above. After the protected peptides resulting from the condensation have been purified, all the protection groups can be removed by the methods described above to obtain the desired crude polypeptide. The crude polypeptide can be purified through a variety of known purification techniques, and the main fractions can be lyophilized, giving the desired amide form of the polypeptides.

To obtain the ester form of betacellulin muteins, the α -carboxyl groups of the amino acids on the carboxyl terminal undergo condensation with a desired alcohol to produce an amino acid ester, and the desired ester form of the polypeptides can then be obtained in the same manner as the amide form.

[0015]

Examples of DNA encoding the betacellulin muteins in the present invention include any DNA comprising DNA encoding a betacellulin mutein in which 1 to 40 amino acid residues from the N terminal of the betacellulin may be deleted, and 1 to 4 amino acid residues of the first through fourth amino acid residues from the C terminal, including the Leu at 3 from the C terminal and the Asp at 4 from the C terminal, may be deleted or substituted with other amino acid residues or other peptide chains. Specific examples include any DNA with a base sequence encoding a betacellulin mutein containing an amino acid sequence represented by SEQ ID NOS: 1 through 14 in the present invention.

More specific examples include (1) DNA containing DNA with a base sequence represented by SEQ ID NOS: 15 through 28 as the DNA encoding

)

THIS PAGE DELETED (8/27/0)

betacellulin mutein having an amino acid sequence represented by SEQ ID NOs: 1 through 14, (2) DNA from mammals hybridizing with a sequence in (1) above under stringent conditions, and (3) DNA which does not form hybrids with the sequences specified in (1) and (2) because of genetic code degeneracy but which codes for a polypeptide having the same amino acid sequence. Hybridization can be performed by publicly known methods or modification thereof. The stringent conditions described above include, for example, a temperature of 42°C, 50% formamide, 4 × SSPE (1 × SSPE = 150 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, H₂O, 1 mM EDTA, pH 7.4), 5 × Denhardt's solution, and 0.1% SDS.

[0016]

Expression vectors for the betacellulin muteins of the present invention, which are used when the betacellulin muteins of the present invention are manufactured by culturing the transformants comprising DNA encoding betacellulin, can be manufactured, for example, by (1) excising target DNA fragments from the DNA encoding a betacellulin mutein of the present invention, and (2) ligating the DNA fragments downstream of a promoter in a suitable expression vector.

Examples of vectors include *E. coli* plasmids (e.g., pBR322, pBR325, pUC12, and pUC13), *Bacillus subtilis* plasmids (e.g., pUB110, pTP5, and pC194), yeast plasmids (e.g., pSH19 and pSH15), bacteriophages such as λ phages, and animal viruses such as retroviruses, vaccinia viruses, and baculoviruses.

Examples of promoters which may be used include any suitable promoters corresponding to the host used to express the gene.

[0017]

When the host is an animal cell during transformation, it can be beneficial to use an SV40-derived promoter, retrovirus promoter, metallothionein promoter, heat shock promoter, cytomegalovirus promoter, SR α promoter, or the like. Preferred examples for *E. coli* hosts include the trp promoter, T7 promoter, lac promoter, recA promoter, λ PL promoter, lpp promoter, and the like, preferred examples for *Bacillus* hosts include the SPO1 promoter, SPO2 promoter, penP promoter, and the like, and preferred examples for yeast hosts include the PHO5 promoter, PGK promoter, GAP promoter, ADH1 promoter, GAL promoter, and the like. When the host is an insect cell, polyhedrin promoters and P10 promoters, etc. are preferred.

In addition to the above, expression vectors can also include enhancers, splicing signals, polyA signals, selection markers, SV40 origin of replication (henceforth, sometimes also referred to as

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SV40ori), and the like as desired. Examples of selection markers include the dihydrofolate reductase (dhfr) gene (methotrexate (MTX) resistance), the ampicillin resistance gene (Amp^r), and the neomycin resistance gene (G418 resistance, sometimes referred to as Neo). Thymidine-free media can be used for selection, particularly in cases where the DHFR gene is used as the selection marker with CHO (dhfr⁻) cells.

A signal sequence adapting the host may be added to the N terminal side of the betacellulin mutein as needed. Preferred examples include a phoA signal sequence, OmpA signal sequence, or the like for *E. coli* hosts. Preferred examples include an α -amylase signal sequence, subtilisin signal sequence or the like for *Bacillus* hosts. Preferred examples include a mating factor α (MF α) signal sequence, invertase signal sequence, or the like for yeast hosts. Preferred examples include an insulin signal sequence, α -interferon signal sequence, antibody molecule signal sequence, or the like for animal cell hosts.

A vector constructed in this manner, containing DNA encoding a betacellulin mutein, can be used to manufacture transformants.

[0018]

Hosts which can be used include, for example, *E. coli*, *Bacillus*, yeasts, insects or insect cells, and animal cells.

Examples of *E. coli* include *E. coli* K12 DH1 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*), 60:160 (1968)), JM103 (*Nucleic Acids Research*, 9:309 (1981)), JA221 (*Journal of Molecular Biology*, 120:517 (1978)), HB101 (*Journal of Molecular Biology*, 41:459 (1969)), C600 (*Genetics*, 39:440 (1954)), and MM294 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:4174 (1976)).

Examples of *Bacillus* include *Bacillus subtilis* MI114 (*Gene*, 24:255 (1983)), and 207-21 (*Journal of Biochemistry*, 95:87 (1984)).

[0019]

Examples of yeasts include *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, and 20B-12.

Examples of insects include silkworm larvae (Maeda et al., *Nature*, 315:592 (1985)).

Examples of insect cells include, in the case of the AcNPV virus, established cell lines derived from larvae of *Spodoptera frugiperda* (Sf cells), MG1 cells derived from *Trichoplusia ni* mid-gut cells, High FiveTM cells derived from *Trichoplusia ni* ovarian cells, cells derived from *Mamestra brassicae*, and cells derived from *Estigmena acraea*. Examples for when the virus is BmNPV include established cell lines derived from *Bombyx mori* N (BmN cells). Examples of Sf cells include

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Sf9 cells (ATCC CRL1711) and Sf21 cells (J.L. Vaughn et al., *in Vitro*, Vol. 13, pp. 213-217 (1977)).

Examples of animal cells include monkey COS-7 cells, Vero cells, Chinese hamster cells CHO, DHFR gene-deficient Chinese hamster cells CHO (dhfr⁻CHO cells), mouse L cells, mouse 3T3 cells, mouse myeloma cells, human HEK293 cells, human FL cells, 293 cells, C127 cells, BALB3T3 cells, and Sp-2/O cells.

E. coli can be transformed, for example, by a method described in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:2110 (1972) or *Gene*, 17:107 (1982).

Bacillus can be transformed, for example, by a method described in *Molecular & General Genetics*, 168:111 (1979).

Yeasts can be transformed, for example, by a method described in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1929 (1978).

[0020]

Insect cells and insects can be transformed, for example, by a method described in *Bio/Technology*, 6, pp. 47-55 (1988).

Animal cells can be transformed, for example, by a method described in *Virology*, 52:456 (1973).

Examples of methods for introducing expression vectors into cells include lipofection method (P.L. Felgner et al. in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 84, p. 7413 (1987)), calcium phosphate method (F.L. Graham and A.J. van der Eb in *Virology*, Vol. 52, pp. 456-467 (1973)), electroporation (E. Nuemann et al. in *EMBO J.*, Vol. 1, pp. 841-845 (1982)) and the like.

Transformants which have been transformed in expression vectors containing DNA encoding the betacellulin muteins of the present invention can be obtained in this manner.

In one method for stable expression of the betacellulin muteins of the present invention using animal cells, cells incorporating an expression vector introduced into the aforementioned animal cells to chromosome are selected by clone selection. Specifically, transformants are selected using the aforementioned selection markers as indicators. It is also possible to obtain stable animal cell lines with a high expression capacity for the betacellulin muteins of the present invention etc. through repeated clone selection of animal cells obtained using selection markers in this manner. When a dhfr gene is used as a selection marker, culture can be carried out as the MTX concentration is gradually increased, and resistant strains can be selected so that intracellular amplification of DNA encoding the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

betacellulin muteins of the present invention together with the dhfr gene gives an animal cell line with even higher expression.

The betacellulin muteins of the present invention can be manufactured by culturing the aforementioned transformants under conditions allowing the expression of DNA encoding the betacellulin muteins of the present invention, and producing and accumulating the betacellulin muteins of the present invention.

When culturing transformants with *E. coli* or *Bacillus* hosts, liquid media are suitable for the culture, and can contain carbon sources, nitrogen sources, inorganic material, and other materials necessary for the growth of the transformants. Carbon sources include glucose, dextrans, soluble starches, and sucrose, and nitrogen sources include inorganic or organic substances such as ammonium salts, nitrates, corn steep liquor, peptone, casein, meat extract, soybean cake, and potato extract. Examples of inorganic materials include calcium chloride, sodium dihydrogen phosphate, and magnesium chloride. Yeasts, vitamins, growth promoting factors, and the like may also be added. The medium pH is preferably about 5 to 8.

[0021]

A preferred media for culturing *E. coli* is M9 medium containing glucose and casamino acid (Miller, *Journal of Experiments in Molecular Genetics*, pp. 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)). A chemical such as 3 β -indoleacrylic acid can be added to enhance the promoter as needed.

In cases where the host is *E. coli*, the culture usually takes about 3 to 24 hours at about 15 to 43°C. The culture can be aerated or stirred as needed.

In cases where the host is *Bacillus*, the culture usually takes about 6 to 24 hours at about 30 to 40°C. The culture can be aerated or stirred as needed.

Examples of media for the culture of transformants with yeast hosts include Burkholder minimum medium (K.L. Bostian et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 77, 4505 (1980), and SD medium containing 0.5% casamino acid (G.A. Bitter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 81, 5330 (1984)). The medium pH may preferably be adjusted to between about 5 and 8. The culture usually takes about 24 to 72 hours at about 20 to 35°C. The culture can be aerated or stirred as needed.

[0022]

Examples of media for the culture of transformants with insect cell hosts include Grace's Insect Medium (T.C.C. Grace, *Nature*, 195:788

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(1962) suitably supplemented with additives such as 10% immobilized bovine serum. The medium pH should be adjusted to between about 6.2 and 6.4. The culture usually takes about 3 to 5 days at about 27°C. The culture can be aerated or stirred as needed.

Examples of media for the culture of transformants with animal cell hosts include MEM medium containing about 5 to 20% fetal calf serum (*Science*, 122:501 (1952)), DMEM medium (*Virology*, 8:396 (1959)), RPMI 1640 medium (*The Journal of the American Medical Association*, 199:519 (1967)), and 199 medium (*Proceedings of the Society for Biological Medicine*, 73:1 (1950)). The pH may preferably be about 6 to 8. The culture was usually performed for 15 to 60 hours at about 30 to 40°C. The culture can be aerated or stirred as needed.

Particularly when CHO (dhfr^r) cells and dhfr genes are used as selection markers, DMEM medium containing dialyzed fetal calf serum with virtually no thymidine is preferably used.

[0023]

The betacellulin muteins of the present invention can be isolated and purified from the aforementioned cultures in the following manner, for example.

When the betacellulins of the present invention are extracted from cultured bacterial cells or cells, the bacterial cells or cells are collected by a publicly known method after completion of the culture and are suspended in a suitable buffer, they are disrupted by ultrasonication, lysozyme treatment and/or by freezing and thawing, etc., and the polypeptide crude extract is then obtained by centrifugation or filtration. The buffer may also contain a protein denaturant such as urea or guanidine hydrochloride, or a surfactant such as Triton X-100 (registered trademark (™)).

When betacellulin muteins are secreted in the culture broth, the bacterial cells or cells are separated from the supernatant by a publicly known method after completion of the culture, and the supernatant is collected.

The polypeptides of the present invention contained in the extract or culture supernatant obtained in this manner can be purified by a suitable combination of publicly known methods of isolation and purification. Examples of such publicly known methods of isolation and purification include methods utilizing the degree of dissolution such as solvent precipitation or salting out, methods utilizing differences primarily in molecular weight such as dialysis, ultrafiltration, gel filtration, and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, methods making

THIS PAGE BLANK (USPTO)

use of differences in charge such as ion exchange chromatography, methods utilizing specific affinity such as affinity chromatography, methods utilizing hydrophobic differences such as reverse phase HPLC, and methods utilizing differences in isoelectric point, such as isoelectric point electrophoresis and chromatofocusing.

When the resulting betacellulin muteins of the present invention are obtained in free form, they can be converted to a salt by a publicly known method or a modification thereof. Alternatively, when they are obtained in the form of a salt, they can be converted to free form or another salt by a publicly known method or a modification thereof.

Betacellulin muteins of the present invention produced by recombinants can be modified as desired through the action of suitable protein-modifying enzymes before or after purification, or the betacellulin muteins can be partially removed. Examples of protein-modifying enzymes include trypsin, chymotrypsin, arginylendopeptidase, protein kinase, and glycosidase.

The resulting betacellulin muteins may be treated in a refolding step as described in Japanese Unexamined Patent Application (Kokai) H10-191989, for example. Betacellulin muteins with an N terminal Met can be subjected to a reaction for removing the Met from the N terminal as described in Japanese Unexamined Patent Application (Kokai) H10-191989 in order to remove the N terminal Met.

The presence of the resulting betacellulin muteins of the present invention can be determined by enzyme immunoassay or the like using specific antibodies.

[0024]

The betacellulin muteins in the present invention or DNA encoding the betacellulin muteins of the present invention can be used in the development of drugs for improving diseases such as diabetes (e.g., insulin-dependent diabetes etc.), pancreatic dysfunction associated with diabetes, or pancreatic dysfunction associated with senile insufficient insulin secretion, and drugs for diseases such as undifferentiated pancreatic cancer (particularly prophylactic and therapeutic drugs for diabetes (such as insulin-dependent diabetes), etc.).

[0025]

Because the betacellulin muteins in the present invention or DNA encoding them have reduced EGF activity and no problems in terms of antigenicity, they can be useful as safe and low toxic drugs. The



THIS PAGE BLANK (USPTO)

polypeptides in the present invention or DNA encoding them can be used as drugs to improve diseases such as diabetes (such as insulin-dependent diabetes), pancreatic dysfunction associated with diabetes, and pancreatic dysfunction associated with insufficient insulin secretion in the elderly, and as therapeutic and prophylactic drugs for diseases such as undifferentiated pancreatic cancer.

The betacellulin muteins or salts in the present invention or DNA encoding them can be used in the conventional manner as the aforementioned drugs. For example, they can be orally administered in the form of coated or enterically coated tablets, capsules, elixirs, microcapsules, and the like, and can be parenterally administered in the form of injections such as sterile solutions with water or other pharmaceutically acceptable liquids, or suspensions. Such preparations can be manufactured, for example, by mixing the compounds or salt in unit dose formulations required for generally recognized preparations, along with physiologically permissible carriers, flavorings, excipients, vehicles, antiseptics, stabilizers, binders, and the like. The content of the active ingredient in such formulations will give a suitable dose within the indicated range.

[0026]

Examples of additives which can be miscible with tablets, capsules, and the like include binders such as gelatin, corn starch, tragacanth gum, and gum arabic, excipients such as crystalline cellulose, swellings such as corn starch, gelatin, and alginic acid, lubricants such as magnesium stearate, sweeteners such as sucrose, lactose, and saccharin, and flavors such as peppermint, Akamono oil, or cherry. In the case of unit formulations in the form of capsule preparations, the material can also include a liquid carrier such as a lipid. Sterile compositions for injections can be formulated by a common method such as dissolving or suspending a naturally produced vegetable oil or the like such as sesame oil or coconut oil and the active ingredient in a vehicle such as water for injection.

Examples of aqueous solutions for injection include physiological saline, isotonic liquids containing glucose or other adjuvants (such as D-sorbitol, D-mannitol, and sodium chloride). Suitable dissolving aids such as alcohols (such as ethanol), polyalcohols (such as propylene glycol and polyethylene glycol), and nonionic surfactants (such as Polysorbate 80™ and HCO-50) can also be used. Examples of oleaginous solutions include sesame oil and soybean oil. Examples of dissolution aids include benzyl benzoate and benzyl alcohol.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Buffers (such as phosphate buffers and sodium acetate buffers), analgesics (such as benzalkonium and procaine hydrochloride), stabilizers (such as human serum albumin and polyethylene glycol), preservatives (such as benzyl alcohol and phenol), antioxidants, and the like can also be blended. Injections are usually packaged in suitable ampules.

The resulting preparation is safe and has low toxicity, and can thus be administered, for example, to humans and mammals (such as mice, rats, guinea pigs, rabbits, chicken, sheep, pigs, cows, cats, dogs, monkeys, sacred baboons, and chimpanzees).

The dosage of the betacellulin mutein in the present invention varies depending on the subjects condition, etc. The orally administered dosage for patients with adult diabetes (per 60 kg body weight) is generally about 0.1 to 100 mg per day, preferably about 1.0 to 50 mg, and even more preferably about 1.0 to 20 mg. The parenterally administered dosage at a time varies depending on the purpose of administration, the target organ, the subject's condition, the method of administration, and so forth. Intravenous injections, for example, as to the administration for patients with adult diabetes (per 60 kg body weight) are generally about 0.01 to 30 mg per day, preferably about 0.1 to 20 mg, and even more preferably about 0.1 to 10 mg. The dosage for other mammals can also be calculated in terms of 60 kg.

[0027]

Abbreviations for bases, amino acids, and the like in the Specification and figures are based on the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature and on abbreviations common in the field. Examples are given below. Optical isomers of amino acids are the L form, unless otherwise specified.

[0028]

DNA: deoxyribonucleic acid

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

A: adenine

T: thymine

G: guanine

C: cytosine

EDTA: ethyleendiaminetetraacetic acid

APMSF: (p-amidinophenyl) methanesulfonylfluoride hydrochloride

SDS: sodium dodecylsulfate

TFA: trifluoroacetic acid



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gly: glycine
 Ala: alanine
 Val: valine
 Leu: leucine
 Ile: isoleucine
 Ser: serine
 [0029]
 Thr: threonine
 Cys: cysteine
 Met: methionine
 Glu: glutamic acid
 Asp: aspartic acid
 Lys: lysine
 Arg: arginine
 His: histidine
 Phe: phenylalanine
 Tyr: tyrosine
 Trp: tryptophan
 Pro: proline
 Asn: asparagine
 Gln: glutamine
 Me: methyl group
 Et: ethyl group
 Bu: butyl group
 Ph: phenyl group
 TC: thiazolidine-4(R)-carboxamide group
 Bom: benzyloxymethyl
 NMP: N-methylpyrrolidone
 PAM: phenylacetamide methyl
 [0030]

Substituents, protection groups, and reagents used frequently in the Specification are represented by the following symbols.

Tos: p-toluenesulfonyl
 HONB: N-hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboxyimide
 Bzl: benzyl group
 Z: benzyloxycarbonyl group
 Br-Z: 2-bromobenzyloxycarbonyl group
 Cl-Z: 2-chlorobenzyloxycarbonyl group
 Boc: t-butyloxycarbonyl group
 HOBt: 1-hydroxybenztriazole
 DCC: N,N'-dicyclohexylcarbodiimide



THIS PAGE BLANK (USPTO)

TFA: trifluoroacetic acid
Fmoc: N-9-fluorenylmethoxycarbonyl group
DNP: dinitrophenyl group
Bum: tertiary butoxymethyl group
Trt: trityl group
[0031]

The SEQ ID NOs: in the Sequence Listing in the specification indicate the following sequences.

[SEQ ID NO: 1]
Amino acid sequence of betacellulin mutein (BTC1-77) of the present invention
[SEQ ID NO: 2]
Amino acid sequence of betacellulin mutein (BTC1-76) of the present invention
[SEQ ID NO: 3]
Amino acid sequence of betacellulin mutein (BTC31-77) of the present invention
[SEQ ID NO: 4]
Amino acid sequence of betacellulin mutein (BTC31-76) of the present invention
[SEQ ID NO: 5]
Amino acid sequence of betacellulin mutein (BTC1-76, 78-80) of the present invention
[SEQ ID NO: 6]
Amino acid sequence of betacellulin mutein (BTC1-76, 78, 79) of the present invention
[SEQ ID NO: 7]
Amino acid sequence of betacellulin mutein (BTC1-76, 78) of the present invention
[SEQ ID NO: 8]
Amino acid sequence of betacellulin mutein (BTC1-77, 79, 80) of the present invention
[SEQ ID NO: 9]
Amino acid sequence of betacellulin mutein (BTC1-77, 80) of the present invention
[SEQ ID NO: 10]
Amino acid sequence of betacellulin mutein (BTC31-76, 78-80) of the present invention
[SEQ ID NO: 11]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Amino acid sequence of betacellulin mutein (BTC31-76, 78, 79) of the present invention

[SEQ ID NO: 12]

Amino acid sequence of betacellulin mutein (BTC31-76, 78) of the present invention

[SEQ ID NO: 13]

Amino acid sequence of betacellulin mutein (BTC31-77, 79, 80) of the present invention

[SEQ ID NO: 14]

Amino acid sequence of betacellulin mutein (BTC31-77, 79) of the present invention

[SEQ ID NO: 15]

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutein represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1

[SEQ ID NO: 16]

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutein represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2

[SEQ ID NO: 17]

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutein represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3

[SEQ ID NO: 18]

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutein represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4

[SEQ ID NO: 19]

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutein represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5

[SEQ ID NO: 20]

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutein represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6

[SEQ ID NO: 21]

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutein represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7

[SEQ ID NO: 22]

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutein represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8

[SEQ ID NO: 23]

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutein represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9

[SEQ ID NO: 24]



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutein represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10

[SEQ ID NO: 25]

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutein represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11

[SEQ ID NO: 26]

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutein represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12

[SEQ ID NO: 27]

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutein represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13

[SEQ ID NO: 28]

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutein represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14

[SEQ ID NO: 29]

Base sequence for primer 1 used in Examples 1 and 4 below

[SEQ ID NO: 30]

Base sequence for primer 2 used in Examples 1 and 4 below

[SEQ ID NO: 31]

Base sequence for primer RI-1 used in Examples 9 below

[SEQ ID NO: 32]

Base sequence for primer RI-3 used in Examples 9 below

[SEQ ID NO: 33]

Base sequence for primer RI-1Cla used in Examples 9 below

[SEQ ID NO: 34]

Base sequence for primer RI-3Xho used in Examples 9 below

[SEQ ID NO: 35]

Amino acid sequence for betacellulin

[SEQ ID NO: 36]

Base sequence of cDNA encoding betacellulin

[0032]

The transformant *E. coli* MM294 (DE3)/pTCIIBTC77 obtained in Example 1 below was deposited under the Accession No. FERM BP-6584 on November 24, 1998 at the National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH), Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry. It was also deposited under the Accession No. IFO 16214 on November 2, 1998 at the Institute for Fermentation (IFO).

The transformant *E. coli* MM294 (DE3)/pTCIIBTC76 obtained in Example 4 below was deposited under the Accession No. FERM BP-6583 on

THIS PAGE BLANK (USPTO)

November 24, 1998 at the National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry. It was also deposited under the Accession No. IFO 16213 on November 2, 1998 at the Institute for Fermentation (IFO).

[0033]

[Examples]

Examples and references are given below to illustrate the present invention in further detail, but the scope of the present invention is not limited by these examples.

[0034]

Example 1 Construction of 77 residue (lacking three C terminal residues) betacellulin expression strain

The 77 residue (lacking three C terminal residues) betacellulin structural gene was amplified by PCR from the pB041 betacellulin expression plasmid (Seno et al, *Growth Factors*, 13:181 (1996)) using a primer 1 (5'-CATATGGATGGGAATTCCACCAGAAGTCCTG) having an NdeI cleavage site and start codon adjacent upstream of the structural gene and a primer 2 (5'-GGATCCCTAGTCAACTCTCTCACACCTTGCTCC) having a stop codon and BamHI cleavage site after the aspartic acid at 77. The gene thus amplified by PCR was ligated to the pCR2.1 vector using a TA original cloning kit (by Invitrogen) to prepare pCR2.1/BTC77. This was introduced to *E. coli* JM109, and transformants were selected using ampicillin resistance and β -galactosidase activity as indicators. Transformants having pCR2.1/BTC77 were cultured, and pCR2.1/BTC77 was prepared using a QIAprep8 Miniprep kit (by Qiagen).

A 77 residue (lacking three C terminal residues) betacellulin expression plasmid was constructed in the following manner. pBR322 was digested with NdeI, the ends were blunted with T4 DNA polymerase (DNA Blunting kit, by Takara Shuzo), and pBRdesNde lacking the NdeI recognition site was prepared by religation. pET3c was digested with Bgl II-EcoRV, approximately 0.26 kbp fragments were recovered, the ends were blunted with T4 DNA polymerase, and pBR/T7 desNde was produced by ligation with the ScaI fragment of pBRdesNde. pBR322desBam lacking the BamHI recognition site of pBR322 was prepared by site-directed mutagenesis (Quick Change, by Stratagene). The SphI-EcoRV fragment of pBR322desBam was ligated with the SphI-EcoRV fragment of pBR/T7desNde, giving the tetracycline resistance expression vector pTCII. pCR2.1/BTC77 was digested with NdeI and BamHI and followed by running agarose electrophoresis, and approximately 240 bp of the 77 residue

THIS PAGE BLANK (USPTO)

betacellulin structural gene was recovered using the QIAquick Spin Purification kit (by Qiagen). The expression vector pTCII was digested with NdeI and BamHI and followed by running agarose electrophoresis, and approximately 4.6 kbp bands were similarly recovered. The 77 residue betacellulin structural gene was ligated with the NdeI-BamHI fragment of the pTCII expression vector and then incorporated into *E. coli* JM109 for selection of transformants by tetracycline resistance, and plasmids were again recovered from the strain, giving the expression plasmid pTCIIBTC77.

The resulting pTCIIBTC77 was incorporated into *E. coli* MM294 (DE3) for selection of transformants by tetracycline resistance, giving the 77 residue betacellulin expression line MM294 (DE3)/pTCIIBTC77. The transformant *E. coli* MM294 (DE3)/pTCIIBTC77 was deposited under the Accession No. FERM BP-6584 on November 24, 1998 at the National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry. It was also deposited under the Accession No. IFO 16214 on November 2, 1998 at the Institute for Fermentation (IFO).

[0035]

Example 2 Culture of 77 residue betacellulin expression strain

The 77 residue betacellulin expression strain MM294 (DE3)/pTCIIBTC77 was cultured for 16 hours at 30°C in 1 L of LB medium (1% peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% sodium chloride) containing 10 mg/L tetracycline. 150 mL of the resulting culture was used to inoculate 2 L jar fermenters containing 1.5 L primary fermentation medium (1.68% sodium monohydrogen phosphate, 0.3% sodium dihydrogen phosphate, 0.1% ammonium chloride, 0.05% sodium chloride, 0.024% magnesium sulfate, 0.02% Nupol LB-625, 0.0005% thiamine hydrochloride, 1.5% glucose, 1.0% casamino acid, 1.0% yeast extract) and the culture was started with aeration and agitation under conditions of 500 rpm, an air flow rate of 2 L/min, and a temperature of 37°C. When the turbidity of the culture reached about 1200 Klett units, 5.95 mg/L isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added. 0.75% glucose was added 1 and 2.5 hours after IPTG addition, and the culture continued until 9 hours after the start of culture. The culture broth was centrifuged for 30 minutes at 10,000 rpm to collect the cells.

[0036]

Example 3 Purification of Met-77 residue betacellulin

10 mL of 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) containing 1 mM EDTA, 1 mM APMSF, and 7 M guanidine hydrochloride was added to 5 g of cells obtained in



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Example 2, the mixture was stirred over night at 4°C for extraction, and then centrifuged (20 min at 10,000 rpm). 250 mL of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.5 mM oxidized type glutathione, 1 mM reduced type glutathione, 1 mM EDTA, 0.1 M arginine hydrochloride, and 2 M urea was added to 10 mL of the resulting supernatant for refolding overnight at 4°C, followed by centrifugation (20 min at 10,000 rpm), resulting in 260 mL of supernatant. The supernatant was concentrated using a YM3 membrane (fraction molecular weight: 3000, by Millipore). 120 mL of 2 M urea was added to 80 mL of the desalted concentrate, and the pH was then adjusted to 5.0 with hydrochloric acid. Supernatant obtained upon 20 min of centrifugation at 10,000 rpm was adsorbed at a flow rate of 10 mL/min onto a SP-Toyopearl 650 M column (2.2 cm × 12 cm, by Tosoh) equilibrated with 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), and the column was washed with the buffer used for equilibration, followed by elution with a linear gradient of 0 to 1.0 M sodium chloride. Fractions containing the Met-77 residue betacellulin were collected, one third of the fraction was adsorbed to a C4P-50 column (1.0 cm × 25 cm, by Showa Denko) equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid, and the Met-77 residue betacellulin was eluted with a linear gradient of 13.5 to 21.2% acetonitrile. Eluate obtained by two more of the same operations was dialyzed against 0.02% trifluoroacetic acid and lyophilized. The lyophilized powder was dissolved in 10 mL distilled water, allowed to flow through an AG1-X8 column (1.0 cm × 10 cm, by Nippon Biorad) treated with acetic acid, and then again lyophilized, giving 8 mg of Met-77 residue betacellulin.

[0037]

Example 4 Construction of 76 residue (lacking four C terminal residues) betacellulin expression plasmid

The 76 residue (lacking four C terminal residues) betacellulin structural gene was amplified by PCR from the pTCII/BTC77 constructed in Example 1 using primer 1 (5'-CATATGGATGGGAATCCACCAGAAGTCCTG) having an NdeI cleavage site and start codon adjacent upstream of the structural gene and a primer 2 (5'-GGATCCCTAAACTCTCTCACACCTTGCTCCAATG) having a stop codon and BamHI cleavage site after the valine at 76. The gene thus amplified by PCR was ligated to the pCR2.1 vector using a TA original cloning kit (by Invitrogen) to prepare pCR2.1/BTC76. This was introduced to E. coli JM109, and transformants were selected using ampicillin resistance and β-galactosidase activity as indicators. Transformants having pCR2.1/BTC76 were cultured, and pCR2.1/BTC76 was prepared using a QIAprep8 Miniprep kit (by Qiagen).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A 76 residue (lacking four C terminal residues) betacellulin expression plasmid was constructed in the following manner. pCR2.1/BTC76 was digested with NdeI and BamHI and followed by running agarose electrophoresis, and approximately 240 bp of the 76 residue betacellulin structural gene was recovered using the QIAquick Spin Purification kit (by Qiagen). The expression vector pTCII obtained in Example 1 was digested with NdeI and BamHI and followed by running agarose electrophoresis, and approximately 4.6 kbp bands were similarly recovered. The 76 residue betacellulin structural gene was ligated with the NdeI-BamHI fragment of the pTCII expression vector and then incorporated into *E. coli* JM109 for selection of transformants by tetracycline resistance, and plasmids were again recovered from the strain, giving the expression plasmid pTCIIBTC76.

The resulting pTCIIBTC76 was incorporated into *E. coli* MM294 (DE3) for selection of transformants by tetracycline resistance, giving the 76 residue betacellulin expression strain MM294 (DE3)/pTCIIBTC76. The transformant *E. coli* MM294 (DE3)/pTCIIBTC76 was deposited under the Accession No. FERM BP-6583 on November 24, 1998 at the National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry. It was also deposited under the Accession No. IFO 16213 on November 2, 1998 at the Institute for Fermentation (IFO).

[0038]

Example 5 Culture of 76 residue betacellulin expression line

The 76 residue betacellulin expression line MM294 (DE3)/pTCIIBTC76 was cultured for 16 hours at 30°C in 1 L of LB medium (1% peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% sodium chloride) containing 10 mg/L tetracycline. The resulting culture was used to inoculate 50 L fermenter tanks containing 20 L primary fermentation medium (1.68% sodium monohydrogen phosphate, 0.3% sodium dihydrogen phosphate, 0.1% ammonium chloride, 0.05% sodium chloride, 0.024% magnesium sulfate, 0.02% Nupol LB-625, 0.0005% thiamine hydrochloride, 1.5% glucose, 1.0% casamino acid, 1.0% yeast extract) and the culture was started with aeration and agitation under the conditions of 210 rpm, an air flow rate of 20 L/min, and a temperature of 37°C. When the turbidity of the culture reached about 1200 Klett units, 5.95 mg/L isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added. 0.75% glucose was added 2 and 3.5 hours after IPTG addition, and the culture continued until 11 hours after the start of culture. The culture broth was centrifuged for 30 minutes at 10,000 rpm to collect 540 g of the cells.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[0039]

Example 6 Purification of Met-76 residue betacellulin

1.0 L of 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) containing 1 mM EDTA, 1 mM APMSF, and 7 M guanidine hydrochloride was added to 375 g of cells obtained in Example 5, the mixture was stirred over night at 4°C for extraction, and then centrifuged (20 min at 10,000 rpm). 19 L of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.5 mM oxidized type glutathione, 1 mM reduced type glutathione, 1 mM EDTA, 0.1 M arginine hydrochloride, and 2 M urea was added to 1.0 L of the resulting supernatant for refolding overnight at 4°C, followed by centrifugation (20 min at 10,000 rpm), resulting in 20 L supernatant. The supernatant was concentrated using a Pelicon cassette system (fraction molecular weight: 5000, by Millipore). 13.2 L of 2 M urea was added to 3.3 L of the desalted concentrate, and the pH was then adjusted to 5.0 with hydrochloric acid. The concentrate was adsorbed at a flow rate of 30 mL/min onto a Poros 50HS column (2.2 cm × 12 cm, by Nippon Perceptive) equilibrated with 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), and the column was washed with the buffer used for equilibration, followed by elution with a linear gradient of 0.3 to 1.3 M sodium chloride. Fractions containing the 76 residue betacellulin were collected, diluted 3-fold with distilled water, then applied to a TSKgel CM-5PW column (2.15 cm × 15 cm, by Tosoh) equilibrated with 50 mM sodium acetate (pH 4.5). Fractions were eluted, from the TSKgel CM-5PW column onto which the Met-76 residue betacellulin had been adsorbed, with a linear gradient of 0.24 to 0.44 M sodium chloride. Fractions containing the Met-76 residue betacellulin were collected and adsorbed to a TSKgel ODS-120T column (2.15 cm × 30 cm, by Tosoh) equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid, and the Met-76 residue betacellulin was eluted with a linear gradient of 17 to 24% acetonitrile. The eluate was dialyzed against 0.02% trifluoroacetic acid and lyophilized. The lyophilized powder was dissolved in 10 mL distilled water, allowed to flow through an AG1-X8 column (1.0 cm × 10 cm, by Nippon Biorad) treated with acetic acid, and then again lyophilized, giving 93 mg of Met-76 residue betacellulin.

[0040]

Example 7 Characterization of betacellulin muteins

The Met-77 residue betacellulin mutein obtained in Example 3 and the Met-76 residue betacellulin mutein obtained in Example 6 were characterized in the following manner.

a) Analysis by SDS-PAGE

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The betacellulin muteins and Met-80 residue betacellulin prepared by the method in Japanese Unexamined Patent Application (Kokai) H10-191989 were suspended in sample buffer (125 mM Tris-HCl, 1% sodium dodecylsulfate, 15% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.005% bromophenol blue), and were electrophoresed on Multigel 15/25 (Dai'ichi Kagaku Yakuhin). Staining of the electrophoresed gel with Rapid CBB Kanto (Kanto Chemical) revealed a single band in virtually all cases (Figure 1).

b) Analysis of amino acid composition

The betacellulin muteins were hydrolyzed in the gas phase for 24 and 48 hours at 110°C with 6 N hydrochloric acid containing 4% thioglycolic acid, and the amino acid composition was determined with an amino acid analyzer (Hitachi L-8500A Amino Acid Analyzer). The results showed that both muteins contained methionine derived from the start codon ATG, and were consistent with the amino acid composition deduced from the cDNA base sequences (Tables 1 and 2).

Table 1: analysis of amino acid composition of 77 residue betacellulin

	Number of residues per mol	Theoretical value
Asx	7.2	7
Thr	6.0	6
Ser	4.6	5
Glx	9.1	9
Pro	3.9	4
Gly	7.1	7
Ala	4.0	4
Val	3.7	4
Met	0.9	1
Ile	2.0	2
Leu	2.1	2
Tyr	3.0	3
Phe	2.1	2
Lys	5.0	5
His	3.0	2
Arg	6.8	7
Cys	ND	8

Table 2: analysis of amino acid composition of 76 residue betacellulin

THIS PAGE BLANK (USPTO)

	Number of residues per mol	Theoretical value
Asx	6.2	6
Thr	6.1	6
Ser	5.1	5
Glx	9.4	9
Pro	4.1	4
Gly	7.4	7
Ala	4.1	4
Val	3.8	4
Met	1.0	1
Ile	2.0	2
Leu	2.0	2
Tyr	3.1	3
Phe	2.1	2
Lys	5.0	5
His	2.3	2
Arg	7.1	7
Cys	ND	8

[0041]

c) Analysis of N terminal amino acid sequence

The N terminal amino acid sequence was analyzed using a gas phase protein sequencer (Applied Biosystems, Model 477A). The results showed that both muteins were consistent with the amino acid composition deduced from the cDNA base sequences. Both muteins had N terminal methionines derived from the start codon ATG just as the 80 residue type did (Tables 3 and 4).

Table 3: Analysis of N terminal amino acid sequence of 77 residue betacellulin

	PTH-amino acid detected (pmole)	Amino acid deduced from base sequence
1	Met (809)	(Met)
2	Asp (492)	Asp
3	Gly (615)	Gly
4	Asn (425)	Asn
5	Ser (161)	Ser
6	Thr (276)	Thr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7	Arg (253)	Arg
8	Ser (66)	Ser
9	Pro (168)	Pro
10	Glu (127)	Glu

Table 4: Analysis of N terminal amino acid sequence of 76 residue betacellulin

	PTH-amino acid detected (pmole)	Amino acid deduced from base sequence
1	Met (195)	(Met)
2	Asp (213)	Asp
3	Gly (413)	Gly
4	Asn (292)	Asn
5	Ser (99)	Ser
6	Thr (151)	Thr
7	Arg (198)	Arg
8	Ser (54)	Ser
9	Pro (149)	Pro
10	Glu (79)	Glu

[0042]

d) Analysis of C terminal amino acids

The C terminal amino acids were determined using an amino acid analyzer (Hitachi L-8500A Amino Acid Analyzer) by gas phase hydrazine decomposition (6 hours at 100°C). Aspartic acid was detected in the Met-77 residue betacellulin, and valine was detected in the Met-76 residue betacellulin (Tables 5 and 6).

Table 5

Analysis of C terminal amino acid in 77 residue betacellulin
Asp (yield: 32.5%)

Table 6

Analysis of C terminal amino acid in 76 residue betacellulin
Val (yield: 77.8%)

[0043]

Example 8 Assay of growth promoting activity using 3T3 cells

As described in *Molecular Cell Biology*, 8:588 (1988), the growth promoting activity was assayed by means of the ³H-thymidine uptake into

THIS PAGE BLANK (USPTO)

stationary 3T3 A31-714 Clone 4 (*International Journal of Cancer*, 12:463 (1973)).

Specifically, using Dulbecco's modified Eagle MEM medium containing 5% bovine serum, 100 μ L 3T3 A31-714 Clone 4 suspended to 1000 cells/mL were inoculated in 96 well plates and cultivated for a day at 37°C in carbon dioxide gas incubators (5% carbon dioxide gas, 95% air). 75 μ L of supernatant was taken, and 100 μ L of serum-free Dulbecco's modified Eagle MEM medium was added to adjust the serum concentration to 1%. Two more days of culture was followed by the addition of varying concentrations of the Met-77 residue betacellulin prepared in Example 3, the Met-76 residue betacellulin prepared in Example 6, and the Met-80 residue betacellulin prepared in accordance with the method described in Japanese Unexamined Patent Application (Kokai) H10-191989. 16 hours after addition of betacellulin, 3 H-thymidine (Amersham Pharmacia Biotech) was added in an amount of 0.25 μ Ci/well, after 4 hours the cells were washed 3 times with PBS, 100 μ L of 5% SDS was added, and the cells were lysed. The cell lysate was transferred to scintillation vials, 1 mL of Scintillator A (Wako Pure Chemicals) was added, and the uptake of 3 H-thymidine into the cell was measured with a scintillation counter (Figure 2).

[0044]

Example 9 Assay of β cell differentiation promoting activity using AR42J cells

Cells of the AR42J cell line derived from pancreatic cancer induced by chemical carcinogens (Christophe, *Am. J. Physiol.*, 266:G963 (1994)) were suspended to a concentration of 10^5 cells/mL using Dulbecco's modified Eagle MEM medium containing 10% fetal calf serum and the Met-77 residue betacellulin prepared in Example 3, the Met-76 residue betacellulin prepared in Example 6, or the Met-80 residue betacellulin prepared in accordance with the method in Japanese Unexamined Patent Application (Kokai) H10-191989. 500 μ L of these suspensions were inoculated to chamber slides and incubated for 5 days at 37°C in carbon dioxide gas incubators (5% carbon dioxide gas, 95% air). After 5 days, the cells were washed once with PBS, fixed in 10% formaldehyde, and treated for 5 min with 0.1% Triton X-100. Block Ace (Snow Brand, Japan) was then added for 40 minutes of blocking at room temperature. Anti-insulin antibodies (by Advanced Immunochemicals) diluted with 10% Block Ace were added, and a reaction was performed for 40 minutes at room temperature. 0.1% Triton X-100 was added, the reaction solution was allowed to stand for 5 minutes at room

THIS PAGE BLANK (USPTO)

temperature, and the cells were then washed three times with PBS. FITC (fluorescein isothiocyanate) labeled anti-mouse IgG antibodies (Cappel) diluted with 10% Block Ace were added, and a reaction was brought about for 40 minutes. 0.1% Triton X-100 was added, the reaction solution was allowed to stand for 5 minutes, the cells were then washed three times with PBS, and they were then observed under a fluorescent microscope. Stained cells, that is, cells which had differentiated into insulin-producing β cells were found in all cases involving the addition of betacellulin (Figure 3).

[0045]

Example 10 Construction of human placenta alkaline phosphatase gene expression vector

The differentiation promoting activity into β cells was also determined using AR42J cells transformed with the vector having alkaline phosphatase which had been ligated as a reporter downstream of the insulin promoter. Specifically, cells which have differentiated into β cells by addition of betacellulin produce alkaline phosphatase. As a result, by assaying the alkaline phosphatase activity, the differentiation promoting activity into β cells can be quantitatively assayed.

Genomic DNA was prepared in the conventional manner from rat tail. The 0.75 kb insulin promoter region was amplified by PCR with a primer RI-1 (5'-AGAGTCAAGGATCCCCCAACCACT-3') and a primer RI-3 (5'-AGCTGGTCACTTAGGGCTGGGG-3') based on the base sequence of the well known rat insulin II gene promoter (GenBank: Accession No. J00748) using the genomic DNA as template. PCR was also carried out using primers RI-1Cla (5'-GAATCGATAGAGTCAAGGATCCCCCA-3') and RI-3Xho (5'-GACTCGAGCTGGTCACTTAGGG-3') using the PCR product as template. The amplified 0.75 kb DNA fragments were isolated, and the pTB1881 plasmid obtained upon insertion into the pT7 Blue vector (Novagen 69820-1) was used to sequence the base sequence of the cloned fragments, confirming that they were the rat insulin promoter. The pTB1881 plasmid was digested with XhoI-ClaI, giving 0.73 kb DNA fragments (rat insulin promoter). The pTB1330 plasmid for the expression of 2.0 kb cDNA (J. Berger et al., *Gene*, 66, 1 (1988)) encoding human placenta alkaline phosphatase (PLAP) was digested with XhoI-HindIII. The resulting 2.7 kb DNA fragments (PLAP cDNA, containing an SV40-derived splicing site and polyA addition site, pBR322-derived ori, and ampicillin resistance gene) were isolated, and the aforementioned rat insulin promoter region

THIS PAGE BLANK (USPTO)

0.73 kb XhoI-CatI fragment was ligated by T4 DNA ligase reaction, giving the plasmid pTB1898.

[0046]

Example 11 Construction of PLAP expression AR42J cells

The pMCneopolyA plasmid (Stratagene) containing the neo^r gene of Tn5 and the PLAP expression plasmid pTB1898 were simultaneously introduced into AR42J cells using the transfection reagent TransITTM-LT1 (Mirus, PenVera Corporation). The plasmid introduced cells were then cultured for 2 days in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, and the culture was then continued in selection medium supplemented with 800 µg/mL G418 (geneticin, Gibco BRL). Clones were isolated by limiting dilution of cells growing with G418 resistance.

Cells of each clone were seeded to 24 well plates and cultured for 4 days with and without the addition of 20 ng/mL Met-80 residue betacellulin. The supernatant was collected and heat treated for 30 minutes at 65°C, and the alkaline phosphatase activity in the media was then assayed. Clones showing increased alkaline phosphatase activity with the addition of 80-residue betacellulin were selected. The results with several clones are given in Table 7 below.

Table 7

Clones	PLAP activity (A 405)	
	No BTC added	BTC added
AR1898-033	0.034	0.366
AR1898-053	0.008	0.089
AR1898-0192	0.077	0.752

[0047]

Example 12 Assay of β cell differentiation promoting activity using PLAP expression AR42J cells

The PLAP expression AR42J cells constructed in Example 11 were suspended to a concentration of 10⁵ cells/mL using Dulbecco's modified Eagle MEM medium containing 10% fetal calf serum and varying concentrations of the Met-77 residue betacellulin prepared in Example 3, the Met-76 residue betacellulin prepared in Example 6, or the Met-80 residue betacellulin prepared in accordance with the method in Japanese Unexamined Patent Application (Kokai) H10-191989. 100 µL of these suspensions were inoculated to 96 well plates and incubated for 5 days at 37°C in carbon dioxide gas incubators (5% carbon dioxide gas, 95% air). After 5 days, the supernatant was taken and treated for 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

minutes at 65°C, and 50 µL was added to 96-well microplates containing 50 µL of 2XSEAP (2M diethanolamine, 1 mM MgCl₂, 20 mM homoarginine). The samples were maintained for 10 minutes at 37°C, 10 µL of 20 mg/mL p-nitrophenylphosphoric acid (Sigma) was then added, and a reaction was brought about for 16 hours at 37°C (Figure 4). The Met-77 residue betacellulin and Met-76 residue betacellulin showed virtually the same promoting activity in inducing differentiation as the Met-80 residue betacellulin.

[0048]

[SEQ ID NO: 1]

Sequence length: 77

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

[Sequence Listing]

Asp	Gly	Asn	Ser	Thr	Arg	Ser	Pro	Glu	Thr	Asn	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5					10					15	
Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	Cys	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Gln	Ser	Lys	Arg	Lys
			20					25					30		
Gly	His	Phe	Ser	Arg	Cys	Pro	Lys	Gln	Tyr	Lys	His	Tyr	Cys	Ile	Lys
	35						40					45			
Gly	Arg	Cys	Arg	Phe	Val	Val	Ala	Glu	Gln	Thr	Pro	Ser	Cys	Val	Cys
	50					55					60				
Asp	Glu	Gly	Tyr	Ile	Gly	Ala	Arg	Cys	Glu	Arg	Val	Asp			
65					70						75				

[0049]

[SEQ ID NO: 2]

Sequence length: 76

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

[Sequence Listing]

Asp	Gly	Asn	Ser	Thr	Arg	Ser	Pro	Glu	Thr	Asn	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5					10					15	
Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	Cys	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Gln	Ser	Lys	Arg	Lys
			20					25					30		
Gly	His	Phe	Ser	Arg	Cys	Pro	Lys	Gln	Tyr	Lys	His	Tyr	Cys	Ile	Lys
	35						40					45			
Gly	Arg	Cys	Arg	Phe	Val	Val	Ala	Glu	Gln	Thr	Pro	Ser	Cys	Val	Cys
	50					55					60				

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val
65 70 75

[0050]

[SEO ID NO: 3]

Sequence length: 47

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

[Sequence Listing]

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys
1 5 10 15
Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys
20 25 30
Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp
35 40 45

[0051]

[SEO ID NO: 4]

Sequence length: 46

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

[Sequence Listing]

```

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys
  1                      5                      10                      15
Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys
      20                      25                      30
Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val
      35                      40                      45

```

[0052]

[SEQ ID NO: 5]

Sequence length: 79

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

[Sequence Listing]

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15
Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys
20 25 30
Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

THIS PAGE BLANK (USPTO)

```

          35              40              45
Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys
          50              55              60
Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe Tyr
          65              70              75

```

[0053]

[SEQ ID NO: 6]

Sequence length: 78

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

[Sequence Listing]

```

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly
 1              5              10              15
Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys
          20              25              30
Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
          35              40              45
Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys
          50              55              60
Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe
          65              70              75

```

[0054]

[SEQ ID NO: 7]

Sequence length: 77

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

[Sequence Listing]

```

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly
 1              5              10              15
Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys
          20              25              30
Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
          35              40              45
Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys
          50              55              60
Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu
          65              70              75

```

[0055]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[SEQ ID NO: 8]

Sequence length: 79

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

[Sequence Listing]

Asp	Gly	Asn	Ser	Thr	Arg	Ser	Pro	Glu	Thr	Asn	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5					10					15	
Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	Cys	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Gln	Ser	Lys	Arg	Lys
		20						25					30		
Gly	His	Phe	Ser	Arg	Cys	Pro	Lys	Gln	Tyr	Lys	His	Tyr	Cys	Ile	Lys
	35						40					45			
Gly	Arg	Cys	Arg	Phe	Val	Val	Ala	Glu	Gln	Thr	Pro	Ser	Cys	Val	Cys
	50						55				60				
Asp	Glu	Gly	Tyr	Ile	Gly	Ala	Arg	Cys	Glu	Arg	Val	Asp	Phe	Tyr	
65					70					75					

[0056]

[SEQ ID NO: 9]

Sequence length: 78

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

[Sequence Listing]

Asp	Gly	Asn	Ser	Thr	Arg	Ser	Pro	Glu	Thr	Asn	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5					10					15	
Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	Cys	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Gln	Ser	Lys	Arg	Lys
		20						25					30		
Gly	His	Phe	Ser	Arg	Cys	Pro	Lys	Gln	Tyr	Lys	His	Tyr	Cys	Ile	Lys
	35						40					45			
Gly	Arg	Cys	Arg	Phe	Val	Val	Ala	Glu	Gln	Thr	Pro	Ser	Cys	Val	Cys
	50						55				60				
Asp	Glu	Gly	Tyr	Ile	Gly	Ala	Arg	Cys	Glu	Arg	Val	Asp	Phe		
65					70					75					

[0057]

[SEQ ID NO: 10]

Sequence length: 49

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

[Sequence Listing]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

```

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys
 1             5             10             15
Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys
             20             25             30
Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe
             35             40             45
Tyr

```

[0058]

[SEQ ID NO: 11]

Sequence length: 48

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

[Sequence Listing]

```

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys
 1             5             10             15
Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys
             20             25             30
Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu Phe
             35             40             45

```

[0059]

[SEQ ID NO: 12]

Sequence length: 47

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

[Sequence Listing]

```

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys
 1             5             10             15
Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys
             20             25             30
Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Leu
             35             40             45

```

[0060]

[SEQ ID NO: 13]

Sequence length: 49

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

[Sequence Listing]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys
 1 5 10 15
 Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys
 20 25 30
 Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe
 35 40 45
 Tyr

[0061]

[SEQ ID NO: 14]

Sequence length: 48

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

[Sequence Listing]

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys
 1 5 10 15
 Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys
 20 25 30
 Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Phe
 35 40 45

[0062]

[SEQ ID NO: 15]

Sequence Length: 231

Type: nucleic acid

Number of strands: double-stranded

Topology: linear

Kind: cDNA

Method for characterization: S

[Sequence Listing]

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60
 AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120
 CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC 180
 TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA C 231

[SEQ ID NO: 16]

Sequence Length: 228

Type: nucleic acid

Number of strands: double-stranded

Topology: linear

Kind: cDNA

Method for characterization: S

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Sequence Listing]

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA	60
AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG	120
CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC	180
TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTT	228

[SEQ ID NO: 17]

Sequence Length: 141

Type: nucleic acid

Number of strands: double-stranded

Topology: linear

Kind: cDNA

Method for characterization: S

[Sequence Listing]

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA	60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA	120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA C	141

[SEQ ID NO: 18]

Sequence Length: 138

Type: nucleic acid

Number of strands: double-stranded

Topology: linear

Kind: cDNA

Method for characterization: S

[Sequence Listing]

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA	60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA	120
GCAAGGTGTG AGAGAGTT	138

[SEQ ID NO: 19]

Sequence Length: 237

Type: nucleic acid

Number of strands: double-stranded

Topology: linear

Kind: cDNA

Method for characterization: S

[Sequence Listing]

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA	60
AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG	120
CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC	180
TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT GTTTTAC	237

[SEQ ID NO: 20]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Sequence Length: 234

Type: nucleic acid

Number of strands: double-stranded

Topology: linear

Kind: cDNA

Method for characterization: S

[Sequence Listing]

GATGGGAATT	CCACCAGAAG	TCCTGAAACT	AATGGCCTCC	TCTGTGGAGA	CCCTGAGGAA	60
AACTGTGCAG	CTACCACCAC	ACAATCAAAG	CGGAAAGGCC	ACTTCTCTAG	GTGCCCCAAG	120
CAATACAAGC	ATTACTGCAT	CAAAGGGAGA	TGCCGCTTCG	TGGTGGCCGA	GCAGACGCCC	180
TCCTGTGTCT	GTGATGAAGG	CTACATTGGA	GCAAGGTGTG	AGAGAGTTTT	GTTT	234

[SEQ ID NO: 21]

Sequence Length: 231

Type: nucleic acid

Number of strands: double-stranded

Topology: linear

Kind: cDNA

Method for characterization: S

[Sequence Listing]

GATGGGAATT	CCACCAGAAG	TCCTGAAACT	AATGGCCTCC	TCTGTGGAGA	CCCTGAGGAA	60
AACTGTGCAG	CTACCACCAC	ACAATCAAAG	CGGAAAGGCC	ACTTCTCTAG	GTGCCCCAAG	120
CAATACAAGC	ATTACTGCAT	CAAAGGGAGA	TGCCGCTTCG	TGGTGGCCGA	GCAGACGCCC	180
TCCTGTGTCT	GTGATGAAGG	CTACATTGGA	GCAAGGTGTG	AGAGAGTTTT	G	231

[SEQ ID NO: 22]

Sequence Length: 237

Type: nucleic acid

Number of strands: double-stranded

Topology: linear

Kind: cDNA

Method for characterization: S

[Sequence Listing]

GATGGGAATT	CCACCAGAAG	TCCTGAAACT	AATGGCCTCC	TCTGTGGAGA	CCCTGAGGAA	60
AACTGTGCAG	CTACCACCAC	ACAATCAAAG	CGGAAAGGCC	ACTTCTCTAG	GTGCCCCAAG	120
CAATACAAGC	ATTACTGCAT	CAAAGGGAGA	TGCCGCTTCG	TGGTGGCCGA	GCAGACGCCC	180
TCCTGTGTCT	GTGATGAAGG	CTACATTGGA	GCAAGGTGTG	AGAGAGTTGA	CTTTTAC	237

[SEQ ID NO: 23]

Sequence Length: 234

Type: nucleic acid

Number of strands: double-stranded

Topology: linear

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Kind: cDNA

Method for characterization: S

[Sequence Listing]

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA	60
AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG	120
CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC	180
TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA CTTT	234

[SEQ ID NO: 24]

Sequence Length: 147

Type: nucleic acid

Number of strands: double-stranded

Topology: linear

Kind: cDNA

Method for characterization: S

[Sequence Listing]

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA	60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA	120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT GTTTTAC	147

[SEQ ID NO: 25]

Sequence Length: 144

Type: nucleic acid

Number of strands: double-stranded

Topology: linear

Kind: cDNA

Method for characterization: S

[Sequence Listing]

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA	60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA	120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT GTTT	144

[SEQ ID NO: 26]

Sequence Length: 141

Type: nucleic acid

Number of strands: double-stranded

Topology: linear

Kind: cDNA

Method for characterization: S

[Sequence Listing]

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA	60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA	120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTTT G	141

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[SEQ ID NO: 27]

Sequence Length: 147

Type: nucleic acid

Number of strands: double-stranded

Topology: linear

Kind: cDNA

Method for characterization: S

[Sequence Listing]

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA	60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA	120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA CTTTAC	147

[SEQ ID NO: 28]

Sequence Length: 144

Type: nucleic acid

Number of strands: double-stranded

Topology: linear

Kind: cDNA

Method for characterization: S

[Sequence Listing]

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA	60
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGACGCCC TCCTGTGTCT GTGATGAAGG CTACATTGGA	120
GCAAGGTGTG AGAGAGTTGA CTTT	144

[0063]

[SEQ ID NO: 29]

Sequence Length: 31

Type: nucleic acid

Number of strands: single-stranded

Topology: linear

Kind: other nucleic acid, synthetic DNA

[Sequence Listing]

CATATGGATG GGAATTCAC CAGAAGTCCT G	31
-----------------------------------	----

[SEQ ID NO: 30]

Sequence Length: 33

Type: nucleic acid

Number of strands: single-stranded

Topology: linear

Kind: other nucleic acid, synthetic DNA

[Sequence Listing]

GGATCCCTAG TCAACTCTCT CACACCTTGC TCC	33
--------------------------------------	----

[SEQ ID NO: 31]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Sequence Length: 24

Type: nucleic acid

Number of strands: single-stranded

Topology: linear

Kind: other nucleic acid, synthetic DNA

[Sequence Listing]

AGAGTCAAGG ATCCCCAAC CACT

24

[SEQ ID NO: 32]

Sequence Length: 22

Type: nucleic acid

Number of strands: single-stranded

Topology: linear

Kind: other nucleic acid, synthetic DNA

[Sequence Listing]

AGCTGGTCAC TTAGGGCTGG GG

22

[SEQ ID NO: 33]

Sequence Length: 26

Type: nucleic acid

Number of strands: single-stranded

Topology: linear

Kind: other nucleic acid, synthetic DNA

[Sequence Listing]

GAATCGATAG AGTCAAGGAT CCCCCA

26

[SEQ ID NO: 34]

Sequence Length: 22

Type: nucleic acid

Number of strands: single-stranded

Topology: linear

Kind: other nucleic acid, synthetic DNA

[Sequence Listing]

GACTCGAGCT GGTCACCTAG GG

22

[SEQ ID NO: 35]

Sequence length: 80

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

[Sequence Listing]

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

THIS PAGE BLANK (USPTO)

	20		25		30										
Gly	His	Phe	Ser	Arg	Cys	Pro	Lys	Gln	Tyr	Lys	His	Tyr	Cys	Ile	Lys
	35					40				45					
Gly	Arg	Cys	Arg	Phe	Val	Val	Ala	Glu	Gln	Thr	Pro	Ser	Cys	Val	Cys
	50					55				60					
Asp	Glu	Gly	Tyr	Ile	Gly	Ala	Arg	Cys	Glu	Arg	Val	Asp	Leu	Phe	Tyr
65					70				75				80		

[SEQ ID NO: 36]

Sequence length: 240

Type: amino acid

Topology: linear

Kind: peptide

Method for characterization: S

[Sequence Listing]

GATGGGAATT	CCACCAGAAG	TCCTGAAACT	AATGGCCTCC	TCTGTGGAGA	CCCTGAGGAA	60
AACTGTGCAG	CTACCACCAC	ACAATCAAAG	CGGAAAGGCC	ACTTCTCTAG	GTGCCCCAAG	120
CAATACAAGC	ATTACTGCAT	CAAAGGGAGA	TGCCGCTTCG	TGGTGGCCGA	GCAGACGCCC	180
TCCTGTGTCT	GTGATGAAGG	CTACATTGGA	GCAAGGTGTG	AGAGAGTTGA	CTTGTTTTAC	240

[0064]

[Effect of the Invention]

The betacellulin muteins and their salts of the present invention have reduced EGF activity and intact BTC activity, with no antigenicity-related problems. They are thus useful as better therapeutic drugs for diabetes.

[0065]

[Brief Description of the Drawings]

[Figure 1] This illustrates the results of electrophoresis of betacellulin muteins (mutated proteins) in Example 7.

[Figure 2] This illustrates the results of the cellular uptake of ³H-thymidine in Example 8.

[Figure 3] This illustrates fluorescent micrograms for cells differentiated into β cells in Example 9.

[Figure 4] This illustrates the results for β cell differentiation promoting activity in Example 12.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



H10-350377

[Document] Abstract

[Abstract]

[Problem to be solved by the Invention] The present invention provides a better therapeutic drug for diabetes.

[Means for solving a problem] A betacellulin mutein or salt thereof, wherein 1 to 40 amino acid residues from the N terminal of the betacellulin may be deleted, and 1 to 4 amino acid residues of the first through fourth amino acid residues from the C terminal, including the Leu at 3 from the C terminal and the Asp at 4 from the C terminal, may be deleted or substituted with other amino acid residues or other peptide chains.

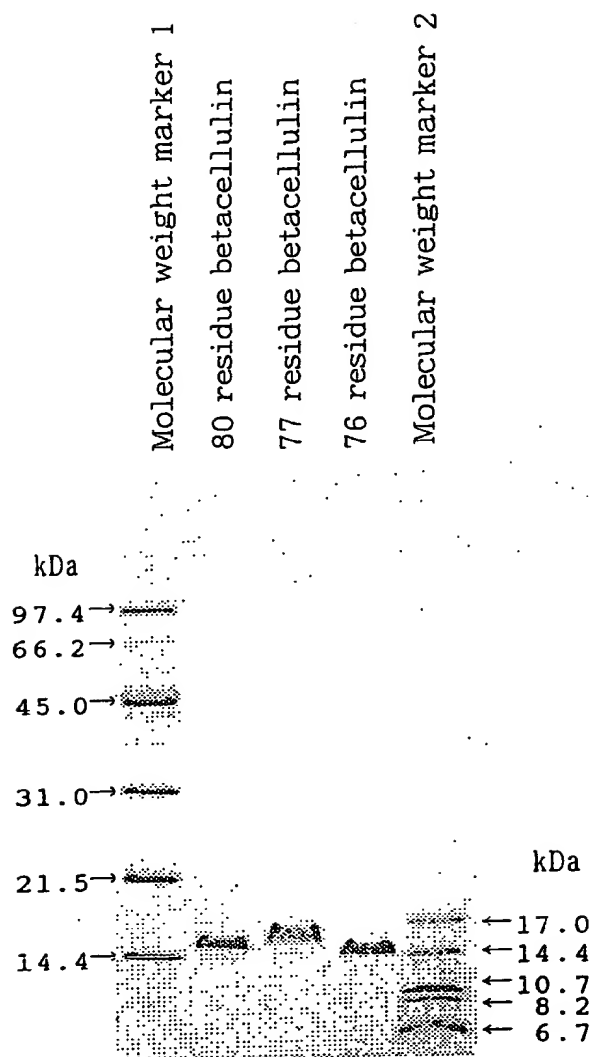
[Effect of the Invention] The betacellulin mutein or its salt of the present invention is useful for better therapeutic drug for diabetes, since they have intact BTC activity and reduced EGF activity, and no antigenicity-related problems.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Document] Drawi

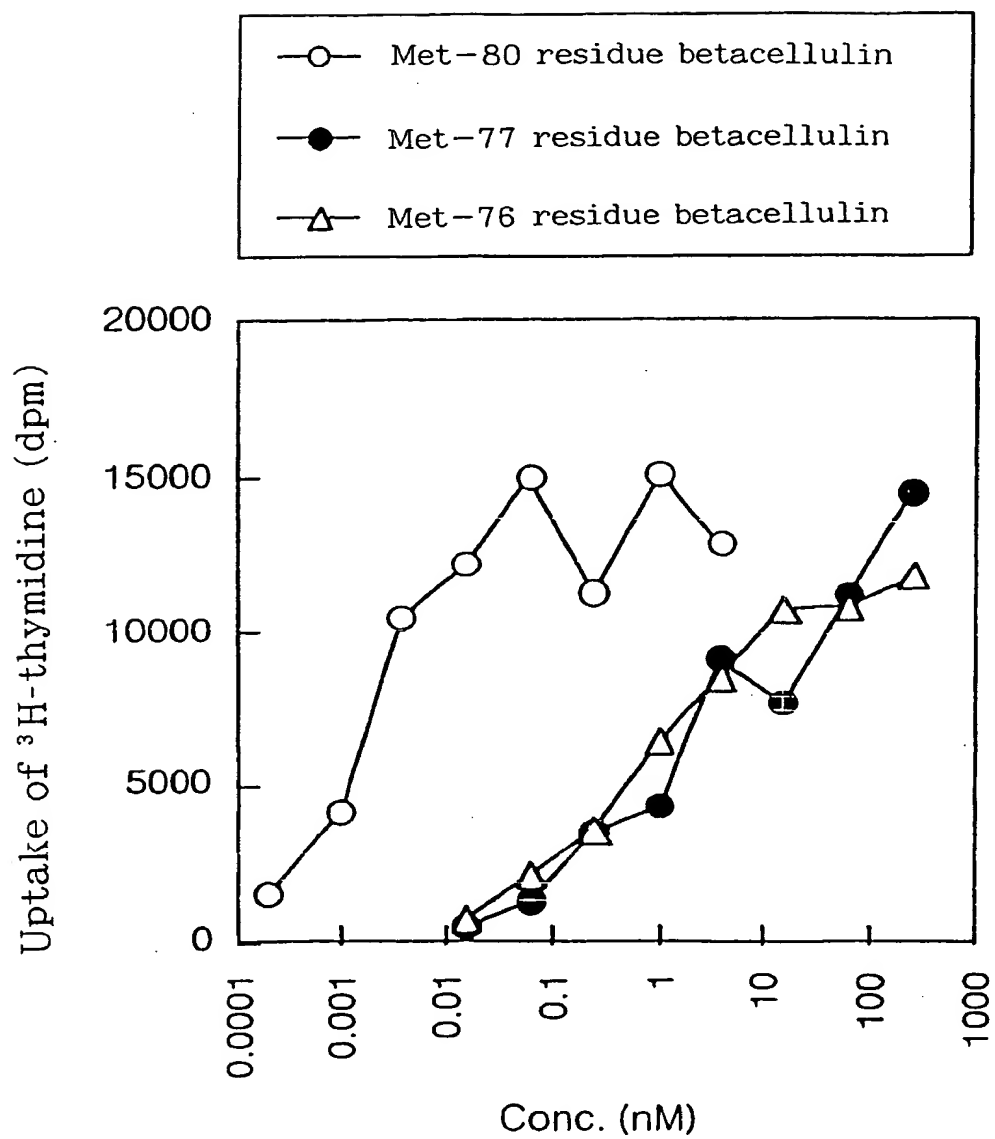
[Fig.1]





THIS PAGE BLANK (USPTO)

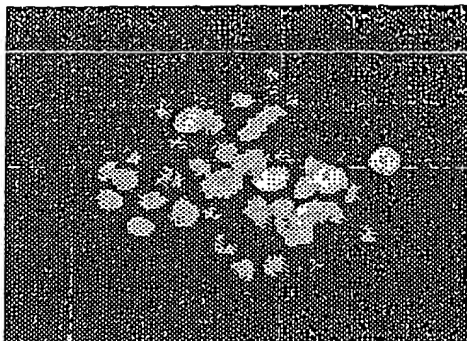
【Fig.2】



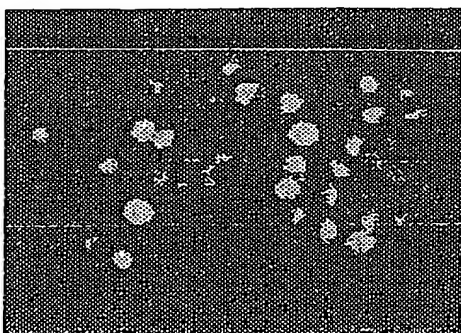


THIS PAGE BLANK (USPTO)

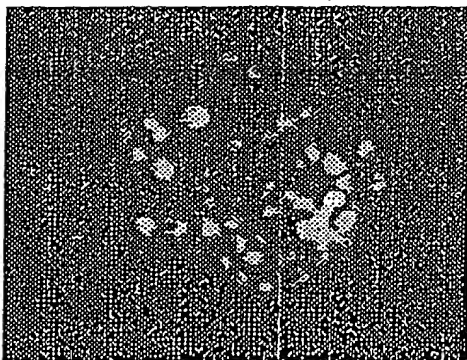
[Fig.3]



Met-76 residue betacellulin



Met-77 residue betacellulin

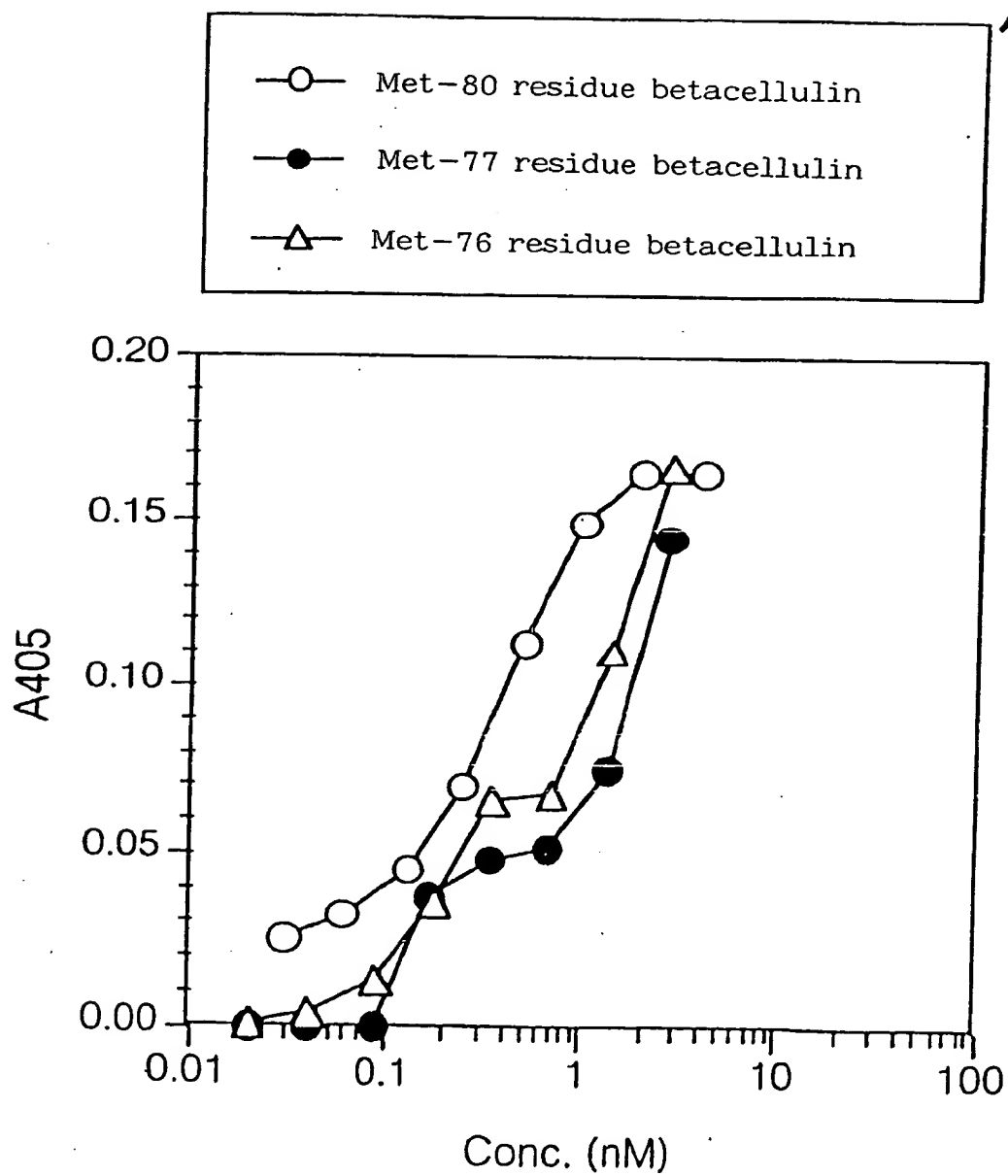


Met-80 residue betacellulin



THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Fig.4]





THIS PAGE BLANK (USPTO)